



T.C.

Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi

Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

Uzmanlık Tezi

**KLİNİK ÖRNEKLERDEN İZOLE EDİLEN ANAEROP
BAKTERİLERİN KONVANSİYONEL YÖNTEM VE MALDİ-
TOF MS İLE TİPLENDİRİLMESİ VE ANTİBİYOTİK
DUYARLILIKLARI**

Dr. Neriman SAAT

Danışman

Prof. Dr. Selahattin ATMACA

Diyarbakır 2018

T.C.

Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi

Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

Uzmanlık Tezi

**KLİNİK ÖRNEKLERDEN İZOLE EDİLEN ANAEROP
BAKTERİLERİN KONVANSİYONEL YÖNTEM VE MALDİ-
TOF MS İLE TİPLENDİRİLMESİ VE ANTİBİYOTİK
DUYARLILIKLARI**

Dr. Neriman SAAT

Danışman

Prof. Dr. Selahattin ATMACA

Diyarbakır 2018

KABUL VE ONAY

Dr. Neriman SAAT tarafından hazırlanan **Klinik Örneklerden İzole Edilen Anaerop Bakterilerin Konvansiyonel Yöntem ve MALDI-TOF MS ile Tiplendirilmesi ve Antibiyotik Duyarlılıkları** adındaki çalışma, _____ tarihinde yapılan savunma sınavı sonucunda jürimiz tarafından Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, **UZMANLIK TEZİ** olarak oybirliği / oyçokluğu ile kabul edilmiştir.

[İ m z a]

[Unvanı, Adı ve Soyadı] (Başkan)

ÖNSÖZ

Uzmanlık eğitimim boyunca büyük bir sabır ve özveri ile bana her konuda destek olan, bilgi ve deneyimlerini benimle paylaşarak bana her zaman yol gösteren, çok değerli hocam ve tez danışmanım Sayın Prof. Dr. Selahattin ATMACA'ya,

Uzmanlık eğitimim boyunca kendilerinden çok şey öğrendiğim, bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım, maddi manevi her konuda desteklerini hissettiğim, sabırla ve anlayışla bana her zaman yardımcı olan çok değerli hocalarım, Anabilim Dalı Başkanımız Sayın Prof. Dr. Kadri GÜL ve Sayın Prof. Dr. Nezahat AKPOLAT hocalarım başta olmak üzere, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'ndaki çok değerli hocalarım Sayın Prof. Dr. Adnan SUAY, Prof. Dr. Mahmut METE ve Prof. Dr. Tuncer ÖZEKİNCİ 'ye,

Tez sürecim ve asistanlığım boyunca bilgi ve deneyimlerini bizimle paylaşan, yorulup sıkılmadan her türlü sorumuza cevap veren çok değerli uzmanımız Sevgili Uzm. Dr. Nida ÖZCAN'a, uzmanlık eğitimim boyunca birlikte çalışmaktan keyif aldığım, özverili, çalışkan asistan arkadaşım Sevgili Dr. Salim YAKUT'a,

Büyük bir özveriyle beni bugünlere getiren, her zaman yanımda olduklarını hissettiren değerli anneme, babama ve sevgili kardeşime, bu zorlu süreçte her konuda sabırla, vefa ile beni destekleyen çok kıymetli eşime, çok sevdiğim, akıllı, anlayışlı, biricik güzel kızıma,

Saygılarımla,

Dr. Neriman SAAT

Diyarbakır 2018

ÖZET

Klinik örneklerden izole edilen anaerop bakterilerin MALDI-TOF MS ve Konvansiyonel Yöntemle tanısı ve antibiyotik duyarlılıklarının belirlenmesi

Bu çalışmada hastanemizde değişik kliniklerden anaerop enfeksiyon şüphesiyle gelen 359 klinik örnek işleme alınarak, anaerop bakterilerin izolasyonu, identifikasyonu ve antimikrobiyal duyarlılıklarının belirlenmesi hedeflenmiştir. Bu 359 klinik örneğin 2'si laboratuvar reddetme kriterlerine göre işleme alınmamış, geri kalan 357 klinik örnekten 95 anaerop bakteri izole edilmiştir. Çalışmamızda 95 anaerop bakterinin 94'ünün cins veya tür düzeyinde identifikasyonu yapılmıştır. 1 anaerop bakterinin tanımlanması ise Gram boyama düzeyinde yapılarak kliniğe bildirilmiştir. Bakterilerin identifikasyonunda klinik örneğin makroskopik ve mikroskopik incelemesinin yanı sıra, identifikasyon diskleri ve MALDI-TOF MS (Matrix aracılı lazer desorpsiyon-kütle spektrofotometrisi) kullanılmıştır. 95 anaerop bakterinin 36'sı pasaj ve antibiyogram aşamasında tekrar üretilememiştir. Bu yüzden kalan 59 anaerop bakteri için antibiyogram yapılabilmıştır. İzolatların antimikrobiyal duyarlılıklarının belirlenmesi için E-test yöntemi kullanılmış, antibiyogram sonuçları sefoksitin için CLSI'a göre, diğer antibiyotikler için EUCAST'e göre değerlendirme yapılmıştır. İzolasyon oranı düşük olduğundan istatistiksel değerlendirme yapılmamıştır.

Anahtar Sözcükler: Anaerop, E-test, MIK, MALDI-TOF MS, Konvansiyonel

ABSTRACT

Laboratory identification of anaerobic bacteria isolated from clinical specimens by MALDI-TOF MS and conventional methods and determination of their antibiotic susceptibilities

In this study, it was aimed to isolate and identify the anaerobic bacteria from different clinical specimens (n: 359) submitted to our laboratory when an anaerobic infection was suspected in patients. In addition, the determination of antimicrobial susceptibilities of isolated organisms was also planned. Of 359 clinical samples, the 2 samples were rejected when rejection criteria were applied. A total of 95 anaerobic bacteria was isolated from the samples (n: 357) handled. Of these 95 isolates, 94 were identified to genus or species level. The identity of the remaining isolate (n: 1) was limited to their Gram stained characteristic and they were reported to the related clinic only with this information. In identification process, both macroscopic and microscopic examinations along with the use of a identification discs and MALDI-TOF MS (Matrix assisted laser desorption mass spectrometry) system, were performed. Of the 95 anaerobic bacteria, 36 were not reproduced during the passage and antimicrobial susceptibility testing phase. Thus, the antimicrobial susceptibility testing was made for the remaining 59 anaerobic bacteria. E-test method was used to determine antimicrobial susceptibilities of isolates, antibiogram results were evaluated according to CLSI for cefoxitin and EUCAST for other antibiotics. Statistical analysis could not be performed due to low rate of isolation.

Key Words

Anaerobe, E-test, MIC, MALDI-TOF MS, Conventional

İÇİNDEKİLER

SayfaNo.

ÖNSÖZ.....	I
ÖZET.....	II
ABSTRACT.....	III
İÇİNDEKİLER.....	IV
TABLolar DİZİNİ	VIII
RESİMLER DİZİNİ	IX
KISALTMALAR VE SİMGELER.....	X
1.GİRİŞ.....	1
2.GENEL BİLGİLER.....	4
2.1.Anaerop Bakterilerin Tarihçesi	4
2.2. Oksijen İhtiyacına Göre Bakteriler	4
2.3. Anaerop Bakterilerin Sınıflandırılması ...	7
2.4. Anaerop Bakterilerin İnsan Florasındaki Dağılımı	8
2.5. Anaerop Bakterilerin Patojenitesi ve Virülans Faktörleri	9
2.6. Anaerop Bakteri Enfeksiyonlarını Düşündüren Faktörler	12
2.7. Anaerop Bakteri Kaynaklı Enfeksiyonlar	13
2.8.Örneklerin Seçilmesi, Alınması ve Taşınması	15
2.8.1.Örneğin Seçimi.....	15
2.8.2.ÖrneğinAlınması	17
2.8.3.Örneğin Nakli	17
2.9.Anaerop Kültür İçin Kullanılan Besiyerleri ve Besiyeri Seçimi.....	18
2.9.1.Selektif Olmayan Genel Üretim Agar Besiyerleri	19

2.9.1.1. Anaerop Kanlı Agar(CDC)	19
2.9.1.2. Brucella Kanlı Agar(BA)	19
2.9.1.3. Schaedler Agar	19
2.9.2. Selektif Agar Besiyerleri	20
2.9.2.1. Kanamisin- Vankomisin (KV) Hemolize Agar.....	20
2.9.2.2. Bacteroides Safra Eskülin (BBE) Agar	20
2.9.2.3. Anaerop Fenil Etil Alkollü (PEA) Agar.....	21
2.9.2.4. Yumurta Sarılı Agar(EYA)	21
2.9.2.5. Sikloserin- Sefoksitin-Fruktoz Agar(CCFA)	22
2.9.3. Geri Dönüş Sıvısı	22
2.9.3.1. Zenginleştirilmiş Tiyoglikolat Broth.....	22
2.9.3.2. Etli- glukozlu Besiyeri	23
2.10. Örneklerin İşlenme Prosedürü.....	23
2.10.1. Makroskopik İnceleme	23
2.10.2. Örneklerin Hazırlanması	23
2.10.3. Gram Boyama	23
2.10.4. Ekim ve İzolasyon Plan.....	25
2.11. Anaerop Kültürde Kullanılan İnkübasyon Sistemleri	27
2.11.1. Anaerop Kabinler	27
2.11.2. Anaerop Jar Sistemi	27
2.11.3. Anaerop Plastik Poşet.....	27
2.11.4. Roll Tüp Sistemi.....	27
2.12. Kültürlerin İncelenmesi ve Değerlendirilmesi	28
2.13. Anaerop Bakterilerin Tanımlanması	30

2.13.1. Seviye 1 İdentifikasyon	30
2.13.2. Seviye 2 İdentifikasyon	31
2.13.3. Seviye 3 İdentifikasyon	34
2.14. Anaerop Bakterilerde Tedavi	34
2.15. Anaerop Bakterilerde Antimikrobiyal Duyarlılık Testleri	37
2.15.1. Agar Dilüsyon	37
2.15.2. Broth Mikrodilüsyon	37
2.15.3. Broth Disk Diffüzyon ve Elüsyon	38
2.15.4. E-test.....	38
2.16. β -Laktamaz Testi.....	39
2.17. Anaeroplardaki Antibiyotik Direnci.....	40
2.17.1. Gram Negatif Anaeroplardaki Antibiyotik Direnci.....	40
2.17.1.1. <i>B.fragilis</i> grup.....	40
2.17. 1.2. <i>Porphyromonas</i> ve <i>Prevotella</i>	42
2.17.1.3. Diğer Gram Negatif Basiller	42
2.17. 2. Gram Pozitif Anaeroplardaki Antibiyotik Direnci	42
2.17.2.1. Sporsuz Gram Pozitif Basiller	42
2.17.2.2. <i>Clostridium</i>	43
2.17.2.3. Gram Pozitif Koklar	43
3. GEREÇ.....	44
3.1. Kullanılan Besiyerleri, Kitler ve Cihazlar	44
3.1.1. Brucella Kanlı Agar (BA)	44
3.1.2. Zenginleştirilmiş Tiyoglikolat Besiyeri	44
3.1.3. Skim Milk.....	45

3.1.4. MALDI-TOF MS	45
3.2. Anaerobik İnkübasyon ve Denetlenmesi.....	48
4.YÖNTEM.....	49
4.1. Örneklerin Toplanması.....	49
4.2. Örneklerin İşleme Alınması	49
4.3. Kültür	50
4.4. İzole Edilen Mikroorganizmaların Tanımlanması	51
4.5. İzole Edilen Anaerobik Bakterilerde Antimikrobiyal Direncin Belirlenmesi..	52
4.5.1. Antimikrobiyal Duyarlılık Testi.....	53
4.5.1.1. E Testin Yapılışı.....	53
4.6. İzolatların Saklanması	56
5. BULGULAR	57
6. TARTIŞMA	63
7. SONUÇ	74
8. KAYNAKLAR.....	76

TABLÖLAR DİZİNİ

Sayfa No.

Tablo 1: Normal insan mikrobiotasında bulunan anaeroplara	8
Tablo 2: Anaerop enfeksiyonu hazırlayıcı faktörler	11
Tablo 3: Anaerop Gram negatif bakterilerin virölans faktörleri	11
Tablo 4: Anaerop bakterilerle oluşan hastalıklar	14
Tablo 5: Anaerop bakterilerin izole edildiği çeşitli enfeksiyonlarda pozitif kültürlerin yüzdesi.....	15
Tablo 6: Anaerop bakterilerin izolasyonunda kullanılan besiyerleri	18
Tablo 7: Anaerop bakterilerin gram boyama ile morfolojik görünümüne göre öntanısı .	24
Tablo 8: Anaerop bakterilerin koloni özelliklerine göre muhtemel tanısı	29
Tablo 9: İdentifikasyon diskleri ile anaerop bakterilerin ön tanısı.....	32
Tablo 10: İdentifikasyon diskleri ile anaerop gram negatif basillerin ön tanısı.....	33
Tablo 11: Anaerop bakterilerle yapılan çalışmalarda duyarlılık test yöntemlerine ait karşılaştırmalar	38
Tablo 12: Anaerop bakterilerle yapılan çalışmalarda duyarlılık test yöntemlerinin avantaj ve dezavantajları	39
Tablo 13: MALDI-TOF MS skor değerlerinin anlamı.....	46
Tablo 14: Çalışmamızda kullanılan Etest striplerinin MİK aralıkları, kodu ve firması ..	53
Tablo 15: Üretici firmanın önerdiği(EUCAST veya CLSI'a göre) duyarlılık ve direnç değerleri.....	56
Tablo 16: Anaerop kültür istemi ile gelen örnek türleri ve üreme oranları.....	58
Tablo 17: Klinik örneklerde aerop üreyen mikroorganizmaların dağılımı	59
Tablo 18: E-test yapılan 59 anaerop bakterinin sayı ve isimleri	60
Tablo 19: 59 anaerop bakterinin antibiyotik direnç sayı ve oranları.....	62

RESİMLER DİZİNİ

Sayfa No.

Resim 1: Bazı anaeroplara gram boyama görüntüleri.....	25
Resim 2: Bazı anaeroplara ana plak görüntüleri	30
Resim 3: Saf kültürden yapılan gram boyama görüntüleri.....	31
Resim 4: Bazı anaeroplara ana plakları, koloni morfolojisi, pigment, hemoliz oluşumu	31
Resim 5: İdentifikasyon diskleri ile tanımlama.....	33
Resim 6: Örneklerin tiyoglikolatlı buyyona alınması	45
Resim 7: Çalışmamızda kullandığımız MALDI-TOF MS cihazı	47
Resim 8: Bazı bakterilerin spektrum görüntüleri	47
Resim 9: Anaerop inkübasyon ve denetlenmesi.....	48
Resim 10: Bazı örneklerin gram boyama görüntüleri	50
Resim 11: İdentifikasyon diskleri ile tanımlama.....	51
Resim 12: Ana plaktan, E-test ve identifikasyon diskleri ile tanımlama için saflaştırma pasajı yapılmış anaeroplara.....	52
Resim 13: Bazı anaeroplara antibiyotik duyarlılıkları	54
Resim 14: <i>A. radingae</i> 'nin E-test yöntemiyle antibiyotik duyarlılıkları ve identifikasyon diskleri ile tanımlanması	55

KISALTMALAR ve SİMGELER

ATP	: Adenozin trifosfat
NAD	: Nikotinamid adenin dinükleotit
CO ₂	: Karbondioksit
UV	: Ultraviyole
BA	:Brucella Agar
KV	:Kanamisin-vankomisin hemolize kanlı agar
µg/ml	:Mikrogram/mililitre
BBE	:Bacteroides safra eskülin (bile esculin) agar
H ₂ S	:Hidrojen sülfür
PEA	:Fenil-etil alkollü agar
EYA	:Yumurta sarılı agar (Egg yolk agar)
CCFA	:Sikloserin-sefoksitin-fruktoz agar
THIO	:Tiyoglikolat
N ₂	:Azot
H ₂	:Hidrojen
PRAS	: Pre-Reduced Anaerobically Sterilized (Anaerobik koşullarda sterilize edilen indirgenmiş besiyeri)
°C	:Santigrat derece
CDC	:Centers for Disease Control
µg	:Mikrogram
SPS	:Sodyumpolianetolesülfonat
FDA	:Food and Drug Administration
MALDI-TOF MS	:Matrix-aracılı lazer desorpsiyon-kütle spektrofotometrisi
CLSI	:Clinical and Laboratory Standards Institute
MİK	:Minimum İnhibitör Konsantrasyonu
ATCC	:American Type of Culture Collection

1. GİRİŞ

Normal vücut florasının önemli bir kısmını oluşturan anaerop bakteriler, ciddi ve hayatı tehdit edici enfeksiyonlara yol açabildikleri için büyük önem taşırlar. Diğer yandan anaerop enfeksiyonların mikrobiyolojik tanısı her zaman mümkün olmamaktadır. Özel üreme ihtiyaçları olan bu bakterilerin klinik örneklerden izole edilmeleri ve identifikasyonu oldukça zor ve zaman alıcı mikrobiyolojik çalışmaları gerektirdiğinden birçok rutin laboratuvar da anaerop bakterilere yönelik tanısal çalışmalar yapılamamaktadır. Bu yüzden anaerop enfeksiyonların tedavisinde genellikle mikrobiyolojik tanı beklenmeksizin ampirik tedaviye başlanmaktadır. Böyle durumlarda enfeksiyonun tanınması kadar, tedavide tercih edilecek antibiyotiklere ilişkin bilgi sahibi olunması da çok önemlidir[1].

Anaerop enfeksiyonların klinik anlamda tanımlanması çok eskilere dayanmaktadır. Öncelikle Hipokrat M.Ö.4'üncü yüzyılda tetanozu tanımlamış, Antonie Van Leeuwenhoek ise 17. yüzyılın sonlarında kendi geliştirdiği mikroskopta gördüğü canlıların oksijensiz ortamda hareketli olduğunu bildirmiştir. 1861 yılında Pasteur, oksijensiz ortamda bazı bakterileri üretmiş, 1863'te mikroorganizmaları aerop ve anaeroplara olmak üzere, oksijensiz ortamda üremelerine göre ikiye ayırmıştır. Sonraki yıllarda, bazı *Clostridium* türlerinin izolasyonuna başlanmıştır. 1800'lü yılların sonunda anaerop bakteriyolojiye önemli katkıları olan Veillon ve Zuber, 1930'larda ise Meleney ve Altemeier isimli iki cerrah anaeroplara ilgili çalışmalarda bulunmuşlar, anaerop bakterilerin kötü kokulu iltihaplı yaralarda rolü olduğunu belirtmişlerdir. 20. yüzyılın başlarında ise araştırmacıların dikkatini anaerop spiroketler ve fusiform bakterilerin neden olduğu çeşitli enfeksiyonlar çekmiştir. Bu zamanlarda Schottmueller lohusalık hummasının etkenin anaerop kokları olabileceği ve endojen kaynaklı olduğu düşünülmüştür. [2, 3].

Gastrointestinal normal bakteriyel florasının baskın komponenti anaerop bakterilerdir. Gaitanın bir gramında 10^{12} bakteri bulunur. Bunların büyük çoğunluğunu oluşturan anaerop bakteriler özellikle kolon florasında çok miktarda

bulunurlar. Ayrıca anaerop bakteriler, obstetrik-jinekolojik, intraabdominal, deri ve yumusak doku, diyabetik ayak enfeksiyonları gibi enfeksiyonlardan sıklıkla izole edilir[4-7].

Malignite, diyabet gibi hastaların immun suprese olduğu özel durumlarda, doku bütünlüğünün bozulmasına neden olabilen cerrahi müdahale ve travma sonrası gibi durumlarda, anaerop mikroorganizmalar, submukozal yüzey ve damarlardan geçiş yaparak, floraya baskın olarak bulundukları doku ve organlarda ciddi seyirli hastalıklara neden olabilmektedirler. Bazı anaerop bakteriler ise daha çok enzim ve toksinleri ile hastalık yaparlar ve böylece bu bakteriler vücuttaki anatomik bariyerleri aşarak toksijenik ve septik sendromlara neden olurlar [3, 8]. Ayrıca, anaerop bakteriler, artan antimikrobiyal direnç ile birlikte morbidite ve mortalitesi yüksek enfeksiyonlara neden olabilmektedirler [9, 10].

20'nci yüzyılın ilk çeyreğinde anaerop koşulların sağlanmasında kullanılan, anaerop bakterilerin izolasyonunda gerekli olan anaerop jarlar geliştirilmiştir. 1960'lı yıllara kadar *Clostridium* türlerinden kaynaklanan enfeksiyonlar, anaerop bakterilerin sebep olduğu enfeksiyonlar içinde en çok incelenen grubu oluşturmuştur. Buna neden olarak da sporsuz anaerop bakterilerin izolasyonunda yaşanan zorluklar gösterilmiştir [2].

Vücutta gastrointestinal sistem, mukozal membranlar ve deri başta olmak üzere vücudun pekçok bölgesinde anaerop bakteriler normal bakteri florası olarak yer almaktadır [2, 3, 8].

Anaerop bakteriler vücutta flora elemanı olarak bulunmakta, çeşitli maddeler sentezleyerek, enfeksiyon etkeni olabilen mikroorganizmaların kolonizasyonunu önlemekte, bunun yanında bağışıklık sistemini dolaylı olarak etkileyip vücuda yararlı olmaktadır [2].

Hassas yapıları nedeniyle anaerop bakterilerin klinik örneklerden izolasyonu zor olabildiğinden, izolasyonun sağlanabilmesi için uygun koşullarda toplama, taşıma ve kültür yöntemleri gerekir. Anaerobik kültürler zahmetli, uzun ve genelde enfeksiyonların polimikrobiyal olması nedeni ile in vitro duyarlılık testleri rutinde

genellikle yapılmaz. Bu yüzden bu enfeksiyonların tedavisi çoğunlukla ampiriktir ve anaerop etkinliği olan bir antimikrobiyal ajan içerir.

Anaerop bakterilerin antibiyotik direnç spektrumu son otuz yılda artmıştır. Günümüzde nitroimidazoller ve karbapenemler gibi güçlü antibiyotiklere karşı bile direnç gözlenebilmektedir ve bu direnç bölgeler arasında değişiklik gösterebilmektedir [11].

Anaerop bakteriler arasında özellikle *Bacteroides* türlerinde görülen direnç dikkat çekicidir [12].

Bu çalışmada, DÜTF (Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi) Hastanesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Bakteriyoloji Laboratuvarına gelen klinik örneklerden, enfeksiyon etkeni olabilecek anaerop bakterilerin izolasyon oranlarının klinik materyallere göre belirlenmesi, izole edilen anaerop mikroorganizmaların MALDI-TOF MS ve identifikasyon diskleri ile tanımlanması ve bu mikroorganizmaların E-test yöntemiyle antimikrobiyal direnç profillerinin belirlenerek bundan sonraki çalışmalara yol gösterecek sürveyans verilerinin elde edilmesi ve etkin tedavilere yol gösterilmesi amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1 Anaerop Bakterilerin Tarihçesi

İnsanlar, oksijensiz ortamda canlılığın var olabileceğine uzun süre ihtimal vermemişlerdir. Birçok canlının yaşayabilmesi için şart olan oksijen, anaerop bakteriler için toksik olmaktadır. Anaerop bakteriler oksijensiz ortamda yaşayabilen mikroorganizmalardır ve insanda flora elemanı olan en yaygın bakterilerdir.

Hipokrat, ilk olarak M.Ö.4.yüzyılda tetanoz hastalığını tarif etmiştir. Fakat anaerop bakterilerin varlığının gösterilmesi ve invitro olarak üretilmeleri yüz yıllar sonra olmuştur. 17. Yüzyıl'da, Antonie Van Leeuwenhoek geliştirdiği mikroskopla oksijensiz ortamda yaşayabilen ve hareketli olan canlıların varlığından bahsetmiştir.

Pasteur 1860'lı yıllarda oksijensiz ortamda bazı mikroorganizmaları üretmiştir ve sonrasında *Clostridium* cinsi bakteriler izole edilebilmiştir. 1877'de Pasteur ve Jubert beraber yaptığı çalışmaların sonucunda *Clostridium septicum*'u üretmiştir. 1800'lü yılların sonunda, Veillon ve Zuber, anaerop bakterilerin kötü kokulu akıntılar ve çeşitli enfeksiyonlar ile ilişkili olduğundan bahsetmişlerdir. 1960'lı yıllara kadar anaerop bakterilerle ilgili çalışmalar özellikle *Clostridium* cinsi üzerine yoğunlaşırken, günümüzde anaerop bakterilerin antimikrobiyal tedaviye yanıtlarıyla ve virülans özellikleri ile ilgili çalışmalar yapılmaktadır [13-15] .

2.2 Oksijen İhtiyacına Göre Bakteriler

Aerobik solunumda atmosferdeki oksijen son hidrojen alıcısıyken, anaerobik solunumda son hidrojen alıcısı, oksijen dışında, N, S ve C gibi maddeleri kullanarak H_2S , NH_3 ve CH_4 gibi ürünler oluşturan maddelerdir. [16] Anaerop bakteriler fermentasyon yoluyla ihtiyacı olan enerjiyi sağlarlar ve oksijeni terminal elektron alıcısı olarak kullanamazlar. Moleküler oksijen anaerop bakterilerin pekçoğu için farklı derecede öldürücü etki gösterir.

Bakterileri oksijen ve karbondioksit ile olan ilişkilerine göre aşağıdaki gibi sınıflandırmak mümkündür [13, 17, 18].

1. Zorunlu aerop bakteriler: Bazı bakteriler oksijensiz ortamda ya hiç üreyemezler ya da çok zayıf ürerler. Bunlara zorunlu aerop bakteriler denir. *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Legionella* cinslerinin üyeleri ve bu gruba örnek olarak verilebilir.

2. Fakültatif anaerop veya fakültatif aerop bakteriler: Hem oksijensiz hem de oksijenli ortamda üreyebilen bakterilerdir. Aerobik solunumu, oksijen varlığında enerji elde etmek için kullanırlarken, oksijen yokluğunda ise fermentasyon yada anaerobik solunumu kullanırlar.

Oksijenli ortamda daha iyi ürerler, çünkü oksijenli ortam daha fazla enerji sağlar.

Süperoksit dismutaz ve katalaz enzimleri vardır. Katalaz ve süperoksit dismutaz organizmanın enerji üretimi sırasında açığa çıkan, toksik hidrojen peroksit ve süperoksit radikallerini uzaklaştıran enzimlerdir [19]. Bu grubun en iyi örnekleri *Klebsiella* spp., *Proteus* spp., *Salmonella* spp. ve *Shigella* spp'dir.

3. Mikroaerofil bakteriler: Bu grup bakteriler üremeleri ve canlılıklarının devamı için %4-6 oranında oksijene ihtiyaç duymakta ve normal havadaki oksijen (Havadaki normal ortalama oksijen oranı %21'dir.) konsantrasyonunda canlılığını devam ettirememektedirler. *Campylobacter* ve *Lactobacillus* türleri bu gruba iyi birer örnektir. Mikroaerofil bakteriler en iyi %5 O₂, %10 CO₂ ve %85 N₂ bulunan ortamda üreyebilmektedir.

4. Aerotoleran anaeroplara: %5-10 CO₂'li ortamda ve normal atmosferde zayıf bir üreme gösteren, anaerop ortamda ise daha iyi üreyen bakterilerdir. *Clostridium histolyticum*, *C. tertium* aerotoleran olan bakterilerdendir. Aerotoleran ve mikroaerofil bakteriler arası sınır keskin değildir.

5. Zorunlu anaerop bakteriler: % 0,5'den daha fazla oksijen varlığında üreyemeyen yada tamamen oksijensiz ortamda üreyen bakterilerdir. *Selenomonas ruminatum*, *Treponema denticola*, *Clostridium haemolyticum*, *C. novyi* tip B, *Bacteroides gracilis* bu gruba örnektir [20, 21].

Anaerop bir bakterinin üretilmesi için iki faktör çok önemlidir:

1. Ortam pH'ının ve ortamdaki oksidasyon-redüksiyon potansiyeli (Eh= redoks potansiyeli) nin uygun olması

2. Ortamdaki hidrojen ve oksijen gazlarının uygun konsantrasyonda olması

Anaerop bakteriler oksijen metabolizmaları için gerekli olan katalaz, peroksidaz ve süperoksit dismutaz gibi enzimleri ve sitokrom sistemini içermediklerinden, oksijen bu bakteriler için oksijen toksik etki göstermektedir [13, 16, 17]. Süperoksit radikalleri, süperoksit dismutaz enzimi ile daha az toksik olan hidrojen peroksit ve moleküler oksijene dönüştürülür. Hidrojen peroksit ise katalaz enzimi ile su (H_2O) ve oksijene (O_2) dönüşür.

Bu enzimlerin yokluğunda oksijen metabolizmasının toksik ürünleri olan süperoksit anyonu (O_2^-) ve serbest hidroksil radikali (OH), hidrojen peroksit (H_2O_2) ve serbest oksijenin (O_2) birikimine neden olmaktadır ve bunun sonucu olarak da bakteri üzerine toksik etki göstermektedirler [13, 16, 17].

Ortamda oksijen yoğunluğu arttıkça bakteri üzerine iki fazlı hasar oluşmakta; bakteriostatik (faz I) ve/veya bakterisidal (faz II) etkiler gözlenmektedir. Faz I evresinde anaerop bakteri oksijenli ortama maruz kaldığında bakterinin gelişiminde yavaşlama yada tam bir durma meydana gelir, bu etki reversible olabilirken bakteri oksijene maruz kalmaya devam ederse Faz II dönemine geçiş olur ve bakteri canlılığını yitirir, olay irreversibildir [13].

Ortamın oksidasyon-redüksiyon (redoks) potansiyeli, anaerop bakterilerin bulunduğu ortamla ilgili önemli bir parametredir, biyolojik ve kimyasal bir sistemin elektron değişimine olan meylinin bir göstergesidir. Oksidasyon elektron kaybı ile olurken, redüksiyon ise elektron kazanılmasına denir. Ortamdaki redüksiyon şiddeti düşük Eh değerleri oksidasyon şiddeti ise yüksek Eh değerleri ile meydana gelir.[13, 16, 17]. Redoks potansiyeli düşük besiyerleri anaerop bakterilerin üremesi için kullanılır. Güçlü redüktan özelliğe sahip olan sistein ve sodyum tiyoglikolat gibi bileşimler besiyerine bu amaçla ilave edilir. Bazı demir bileşikleri, kıyma, karaciğer, et parçaları, glikoz, sodyum sülfid, balık eti, ayrıca besiyerine konulacak demir parçaları da redüktan olarak kullanılabilir ve besiyerlerinin oksidasyon redüksiyon

potansiyelinin düşmesini sağlayıp anaeroplara üremelerini mümkün kılar. Bu redükta ajanların ortama ilave edilmesinin başka bir sebebi ise ortamdaki çözünmüş halde bulunan oksijeni bağlamak yada azaltmaktır [13, 18].

2.3 Anaerop Bakterilerin Sınıflandırılması

Anaerop bakteriler morfolojik özelliklerine göre şu şekilde sınıflandırılırlar: [22]

1. Gram pozitif koklar
 - *Peptostreptococcus*
 - *Peptococcus*
 - *Anaerococcus*
 - *Atopobium*
 - *Finegoldia*
 - *Peptoniphilus*
 - *Ruminococcus*
 - *Gemella*
 - *Sarcinia*
2. Gram negatif koklar
 - *Veillonella*
 - *Megasphaera*
 - *Acidominococcus*
 - *Anaeroglobus*
 - *Negativococcus*
3. Gram pozitif basiller
 - Sporlular:
 - *Clostridium* türleri
 - *Filifactor villosus*
 - Sporsuzlar:
 - *Propionibacterium* türleri
 - *Eubacterium* türleri
 - *Eggerthella*
 - *Bulleida*
 - *Actinomyces* türleri
 - *Bifidobacterium dentium*
 - *Mobilincus* türleri
 - *Laktobacillus* türleri
 - *Atopobium* türleri

4. Gram negatif basiller

- *Bacteroides*
- *Fusobacterium* (*F.nucleatum*, *F.necrophorum*,...)
- *Prevotella* (*P.corporis*, *P.denticola*,.....)
- *Porphyromonas*
- *Bilophila*
- *Selenomonas*
- *Dialister*

Kabaca yapılan bu sınıflandırmada moleküler tekniklerin kullanıma girmesi ile bakterilerin sınıflandırmasında değişiklikler olmuş ve belli taksonlar arası ilişkiler kuvvetlenirken bazıları ise grubundan ayrılmış ve farklı bir taksona dahil edilmiştir. Ayrıca fenotipik tanı yöntemlerinin ve antimikrobiyal duyarlılık paternlerinin sınırlılıklarına rağmen önlemlerini koruması sınıflandırmada büyük değişikliklere neden olmuştur. Örneğin *Bacteroides*, *Firmicutes*, *Actinobacteria*, *Fusobacterium* ve *Proteobacteria* şubesi içine pek çok yeni tür ve cinsler tanımlanarak yeni taksonlara dahil edilmiştir [22].

2.4 Anaerop Bakterilerin İnsan Florasındaki Dağılımı

Anaerop bakteriler normal insan vücut florasının çoğunluğunu oluşturmaktadır. Normal florayı oluşturan bu anaerop bakteriler, konak sağlığının korunması açısından anlamlı role sahiptirler[13, 14]. Bu bakteriler insan vücudunda, gastrointestinal sistem, vajina, üst solunum yolları, burun, ağız gibi dış ortamla irtibatlı mukoza yüzeylerinde ayrıca deride de flora elemanı olarak bulunurlar. Normal insan florasında mevcut olabilen anaerop bakteriler Tablo 1’de özetlenmiştir.

Tablo 1. Normal insan mikrobiotasında bulunan anaeroplara[23]

Ağız Boşluğu ve Üst Solunum Yolları
<i>Porphyromonas</i> spp, pigmentli <i>Prevotella</i> spp. Pigmentsiz <i>Prevotella</i> spp.(örn: <i>P. oralis</i>) <i>Bacteroides</i> spp.(örn: <i>B. Ureolyticus</i>) <i>Veillonella</i> spp. <i>Fusobacterium</i> spp.(örn: <i>B. Ureolyticus</i>) Anaerop gram pozitif koklar <i>Actinomyces</i> spp. ve <i>Propionobacterium</i> spp.

Mide (Beslenme sırasında)
<i>Lactobacillus</i> 'lar
İnce Bağırsak (Proksimal Kısım)
<i>Lactobacillus</i> 'lar
Mikroaerofilik streptokoklar
Kalın Bağırsak (ve Terminal ileum)
<i>Bacteroides fragilis</i> grup
<i>Fusobacterium</i> spp.
<i>Porphyromonas</i> spp.
Anaerobik gram pozitif ve gram negatif koklar-çok sayıda türü
<i>Propionobacterium</i> spp.
<i>Bifidobacterium</i> spp.
<i>Eggerthella</i> spp.
<i>Eubacterium</i> spp.
<i>Clostridium</i> spp.
Diğer anaerop gram pozitif basiller
Genitoüriner Sistem; Vajen ve Serviks
<i>Porphyromonas</i> spp, pigmentli <i>Prevotella</i> spp.
<i>Bacteroides</i> spp.
Pigmentsiz <i>Prevotella</i> spp.
<i>Lactobacillus</i> spp.
<i>Eggerthella</i> spp.
<i>Eubacterium</i> spp.
<i>Clostridium</i> spp.
<i>Propionobacterium</i> spp.
<i>Veillonella</i> spp.
Anaerop gram pozitif koklar
<i>Mobilincus</i> spp.
<i>Atopobium</i> spp.
Üretra (Kadın ve Erkek)
<i>Propionobacterium</i> spp.
<i>Prevotella</i> spp.
<i>Bacteroides</i> spp.
<i>Fusobacterium</i> spp.
Anaerobik gram pozitif ve gram negatif koklar
Cilt
Anerobik koklar
<i>Porphyromonas</i> spp

2.5 Anaerop Bakterilerin Patojenitesi ve Virulans Faktörleri

Bakterinin virülans faktörleri, anaerop bakteri enfeksiyonlarının patogeneğinde önemli role sahiptir. Bunlar arasında ekzoenzimler (fibrinolizin, nöraminidaz, heparinaz, hemolizin, proteaz, kollajenaz, kondroitin sülfataz, N-asetil

glukozaminidaz ve glukronidaz), metabolik ürünler (sülfür bileşikleri, uçucu yağ asitleri, aminler), adezyon faktörleri (kapsül, fimbria, hemaglütinin, lektin, koagregasyon), invazyon faktörleri (fosfolipaz C), antifagositik ve antilitik faktörler (IgA proteaz, kapsül, lipopolisakkarit) ve sayılabilir [24].

1960’lardan önce, genellikle klostridyal kaynaklı enfeksiyonlar insanda anaerop enfeksiyon etkeni olarak biliniyordu. Ancak günümüzde bunlar daha nadir görülmekte olup, anaerop enfeksiyonlar daha çok endojen kaynaklıdır. Genelde doku nekrozu, vasküler staz, doku bütünlüğünün bozulması gibi durumlar veya başka hazırlayıcı nedenlerle anaerop enfeksiyonlar oluşmakta ve bu enfeksiyonlar çoğunlukla fakültatif anaeroplardan da karıştığı mikst enfeksiyonlar şeklinde karşımıza çıkmaktadır [13, 14, 17, 25].

Anaerop enfeksiyonların patogeneğinde rol alan önemli faktörler şunlardır: [14, 26]

1. Anatomik bariyerde bozulmaya neden olabilen travma, cerrahi gibi durumlar,
2. İmmün sistem ile ilişkili problemlerde, antikor cevabı, kompleman sistemi aktivasyonu, polimorfonükleer lökositlerle (PMNL) cevap ve hücresel tip immün (T hücreleri) cevapta azalma ile konağın savunma mekanizmalarında bozulma,
3. Oksidasyon-redüksiyon potansiyelinin azalması,
4. Bakteriyel inokulumun miktarı,
5. Diğer mikroorganizmalar ile sinerji etkisi,
6. Mikroorganizmanın virulans özellikleri, yapışma, invazyon, bakteriye ait yüzey yapıları, toksinler ve enzimler anaerop bakterilerin patogeneğinde etkili olan faktörlerdir.

Anaerop enfeksiyonların primer kaynağı genelde normal floradır ve sıklıkla polimikrobiyal enfeksiyon oluştururlar.

Anaerop enfeksiyonlara zemin oluşturan durumlar özet şeklinde Tablo 2’de verilmiştir.

Tablo 2. Anaerop enfeksiyonu hazırlayıcı faktörler [14, 26]

Genel Nedenler	Azalmış Redüksiyon Potansiyeli
İmmüsupresyon	Yanıklar
Nötropeni	Obstrüksiyon ve staz
Malignite	Doku anoksisi
Splenektomi	Doku yıkımı
Sitotoksik ilaçlar	Yabancı cisim
Kortikosteroidler	Vasküler yetmezlik
Diabetes mellitus	Aerop enfeksiyon varlığı
Hipogamaglobulinemi	Kalsiyum tuzları
Kollajen damar hastalıkları	

Yukarıda belirtilen durumlar ve burada bahsedilmeyen pek çok hastalıkta, vücudun anatomik bariyerinin bozulması yada immün sorunlar sonucunda anaerop bakterilerin normal flora bakterisi olarak bulundukları bölgelerden özellikle steril olan başka bölgelere geçmesi ile anaerop enfeksiyonların oluşması ortak özellik olarak ortaya çıkmaktadır. Yani anaerop enfeksiyonların çoğunluğu flora kaynaklı olduğu için endojen kaynaklı enfeksiyonlardır. Bu yüzden konağın sağlık durumu ile yakından ilişkilidir. Anaerop gram negatif bakterilerin virülans faktörleri Tablo-3’de gösterilmiştir [27]:

Tablo 3. Anaerop Gram negatif bakterilerin virulans faktörleri

<i>B.fragilis</i>
Kapsüler polisakkarit, proteazlar, hemaglutinin, nöraminidaz, enterotoksin
<i>Prevotella spp.</i>
Lipopolisakkarit, proteaz
<i>Porphyromonas gingivalis</i>
Lipopolisakkarit, proteaz, hemolizin, kapsül
<i>F. nucleatum</i>
Lipopolisakkarit, proteazlar, adhezin
<i>F.nechrophorum</i>
Lipopolisakkarit, proteaz, hemolizin, lökotoksin, fosfolipaz

Anaerop bakteriler arasında virulans faktörleri açısından en iyi bilinenler *Clostridium* türleri tarafından sentezlenen ekzotoksinlerdir. Bilinen en potent mikrobiyal toksinler *C.botulinum* ve *C.tetani* tarafından sentezlenen ekzotoksinlerdir. *C.perfringens*'in major toksini Fosfolipaz C(a toksini)dir. Bu enzim trombositler, endotel hücreleri, eritrositler ve kas hücrelerinin hücre membranlarındaki lesitin ve sifingomiyelini hidrolize eder. Alfa toksin, *C. perfringens* tarafından üretilen diğer toksinlerle beraber, kapiller permeabiliteye etki eder. Ayrıca bu bakteri ek olarak bir kollagenaz üretir. *C.tetani* tarafından tetanospazmin ve tetanolizin enzimlerini üretir, tetanospazmin inhibitör etkiye sahip nörotransmitterolan GABA ve glisin salınımını engeller, tetanolizin enzimi ise hemolitik etki gösterir. *C.botulinum* tip A toksini, hemaglutinin ve nörotoksin salgılar. Nörotoksin asetilkolin salınımını engeller ve gevşek paralizi oluşturur. Toksin A enterotoksin, toksin B ise sitotoksin *C.perfringens* ve *C.difficile*'nin sitolitik toksinleridir. Bu toksinler doku yıkımına, bölgesel beslenme bozukluğuna neden olmakta ve bakterilerin üreyebilmesi için uygun bir ortam oluşturmaktadır [28, 29].

Butirik asit, *Porphyromonas* spp. tarafından salgılanır, memeli hücre kültürlerinde sitotoksik etki oluştururken, süksinik asit *Bacteroides* türlerince oluşturulmakta, abse oluşumu için zemin hazırlamakta ve polimorf nüveli lökosit (PMNL) göçünü önlemektedir. Follikül dibinde oluşturduğu propionik asitin iritan etkisi ile *Propionibacterium acnes*, komedon oluşumunda önemli rol oynamaktadır [13].

2.6 Anaerop Bakteri Enfeksiyonlarını Düşündüren Faktörler

Anaerop enfeksiyonlar sıklıkla göz ardı edilmektedir. Bunun nedenleri arasında bakterilerin kültürde üretilmesinin ve daha sonra tanımlanmasının zaman alıcı, zahmetli, maliyetli olması ve öneminin tam anlamıyla anlaşılamaması sayılabilir. Fakat bazı belirti ve bulgular anaerop enfeksiyona bizi yönlendirmektedir. Bunlardan başta geleni bir organ yada dokuda, lezyon bölgesinden gelen kötü kokudur. Bundan başka klinisyenlere enfeksiyon bölgesinde anaerop bakteri varlığını düşündürmesi gereken bazı özellikler şunlardır [2] :

1. Lezyon bölgesinden gelen akıntıda ve lezyonda kötü koku,
2. Enfeksiyon alanının mukoza yüzeyine uzak olması,
3. Akıntıda veya dokuda gaz gözlenmesi,
4. Gangren, doku nekrozu ve apse oluşumu (krepitasyon),
5. Septik tromboflebitler,
6. Malign bir hastalığı olan kişilerde gelişen enfeksiyonlar (uterus, kolon, akciğer kanserleri gibi),
7. Kanlı eksudaların renginin siyaha dönmesi, ultraviyole ışık altında bakıldığında floresans vermesi,
8. Hayvan ve insan ısırıklarından sonra gelişen enfeksiyonlar,
9. Trimetoprim-sülfametoksazol, aminoglikozidler, monobaktam, birinci jenerasyon kinolonlar ve anaeroplara etkisinin yeterli olmadığı bilinen seftazidim gibi antibiyotiklerle yanıt alınamayan tedavi,
10. Rutin kültürde üreme saptanmamasına rağmen örneğin Gram boyamasında mikroorganizma görülmesi.

2.7 Anaerop Bakteri Kaynaklı Enfeksiyonlar

Anaerop bakteriler insanın hemen hemen bütün organlarında enfeksiyona neden olabilirler. Anaerop enfeksiyonlar endojen ve eksojen kaynaklı olabilir. Fakültatif anaeroplara oluşturduğu enfeksiyonların etkisiyle yada doku nekrozu, travma, vasküler staz gibi durumlarda dokulardaki oksijen miktarının ve oksidasyon-redüksiyon potansiyelinin azalması sonucu, zorunlu anaerop bakterilerin çoğalması için uygun faktörler hazırlanmış olur. Anaerop bakterilerle oluşan enfeksiyonlar genelde polimikrobiyaldir. Anaerop bakterilerin yanı sıra, mikroaerofil bakteriler, fakültatif anaeroplara da enfeksiyona neden olabilirler [17, 30].

Anaerop bakterilerin sebep olduğu hastalıklar kaynağına göre iki başlıkta incelenebilir:

1. Eksojen anaerop enfeksiyonlar,
2. Endojen anaerop enfeksiyonlar.

Anaerop bakterilerle oluşan hastalıklar ve anaerop bakterilerin izole edildiği enfeksiyonlardaki pozitif kültür yüzdesi Tablo 4 ve Tablo 5'te gösterilmiştir [23]:

Tablo 4. Anaerop bakterilerle oluşan hastalıklar

EKZOJEN KAYNAKLI ANAEROP ENFEKSİYONLAR	ENDOJEN KAYNAKLI ANAEROP ENFEKSİYONLAR
• Yara botulizmi • Yenidoğan botulizmi • Gıda kaynaklı botulizm • Miyonekrozis (gazlı gangren) • Tetanoz • İyi huylu yüzeysel enfeksiyonlar • Bağımlılarda ilaç enjeksiyonu ile ilgili enfeksiyonlar • Hayvan yada insan ısırıkları ile ilişkili enfeksiyonlar • Septik abortus • Krepitan (anaerobik) selülit • <i>Clostridium difficile</i> nosocomial diyaresi	• Aktinomikoz • Bakteriyemi • Aspirasyon pnömonisi • Herhangi bir organ apsesi • Bakteriyel vajinoz • Krepitan ve nonkrepitan selülit • Endokardit • Apandisit yada kolesistit komplikasyonları • Dental ve periodontal enfeksiyonlar • Nekrotizan fasit • Osteomiyelit • Kronik otitis media • Subdural ampiyem • Menenjit (genellikle beyin apsesi ilişkili) • Endoftalmitis (genellikle katarakt ameliyatı sonrası) • Lemierre sendromu (<i>Fusobacterium necrophorum</i>) • Peritonit • Septik artrit • Kronik sinüzit • Torasik ampiyem

Anaerop bakterilerden kaynaklanan bu enfeksiyonlar vücudun pek çok bölgesinde oluşabilmektedir. Hem mikrobiyologların hem de klinisyenlerin son yıllarda anaerop bakteri enfeksiyonları hakkında olan bilgileri anlamlı şekilde artmasına rağmen hala en sık gözden kaçırılan mikroorganizma grubu olmaya devam etmektedir. Ayrıca izole edilmelerinin zaman alıcı, zahmetli ve masraflı olması diğer dezavantajlarıdır. Bunlara rağmen anaerop enfeksiyonların oldukça sık görüldüğü, hatta bu oranların bazı vücut bölgelerinde %100 civarında olabildiği unutulmamalıdır.

Tablo 5: Anaerop bakterilerin izole edildiği çeşitli enfeksiyonlarda pozitif kültürlerin yüzdesi

ENFEKSİYON TİPİ	ANAEROP YÜZDESİ (%)
Pulmoner : - Aspirasyon pnömonisi - Ampiyem (torasik) - Akciğer absesi	62-93 22-36 58-100
Beyin absesi	62-83
Bakteriyemi	1-17
Dental, oral, fasiyal	67-100
Sinüzit - Akut sinüzit - Kronik sinüzit	<10 48-100
Pelvik abse	50-100
Yumuşak doku enfeksiyonları - Isırık yaraları - Gazlı gangren (klostridial) - Klostridial olmayan krepitan selülit - Diyabetik ayak ülserleri	50-70 100 75 50-90
Abdominal - Karaciğer absesi - İntraabdominal	<60 60-100
Çeşitli enfeksiyonlar - Menejit - Üriner sistem enfeksiyonları	<10 <5

2.8 Örneklerin Seçilmesi, Alınması ve Taşınması

2.8.1 Örneğin Seçimi

Anaerop enfeksiyonlarda tanıyı doğru koyabilmek için gerekli en önemli kural örneğin seçimidir.

Anaerop kültürde doğru tanıyı koyabilmek için öncelikli olarak normal insan mikrobiotasından sakınılmalıdır. Optimal kabul edilebilecek örnekler, apseler, steril

vücut sıvıları, aspiratlar veya normalde steril olan bölgelerden alınan sıvı ve biyopsi örnekleridir. Anaerop kültür için genel bir kural olarak doku veya sıvı örnekleri tercih edilmelidir. Sürüntü örneklerinden kaçınılmalıdır [23].

Normal flora nedeni ile kontaminasyondan kaçınılamayacağı ve bu nedenle sonuçlar sağlıklı yorumlanamayacağı için anaerop örnek seçiminde uygun olmayan ve alınması tavsiye edilmeyen örnekler aşağıda liste halinde verilmiştir [14, 23]:

1. Gingival sürüntü örneği
2. Boğaz veya nazofarengeal sürüntü örnekleri
3. Ekspektore edilen balgamyada bronkoskopik örnekler
4. Yeterli dekontaminasyon işleminin yapılamadığı müköz membranlara veya cilde bitişik bölgelerden alınan materyaller
5. Çift lümenli, koruyuculu olmayan bronkoskop ile alınmış olan bronkoskopi örnekleri
6. Mide ve ince barsak içeriği (kör loop ve benzeri sendromlar hariç)
7. Kalın barsak içeriği, kolostomi, ileostomi, rektal sürüntü, feçes örneği veya kolo-kutanöz fistül örnekleri (*C.difficile* yada *C.botulinum*'un etken olma ihtimali düşünülen hastalık hariç)
8. Miksiyon ile alınan idrar örneği
9. Dekübitis ülserlerinin, yaraların, eskar dokularının, perirektal abse ve pilonidal sinüs kanallarının yüzeylerinden alınan sürüntü örnekleri

Kaliteli ve anlamlı bir anaerop bakteri kültürü, anaerop etkenlerin üreyebileceği uygun bölgelerden seçilmiş, uygun şartlarda alınmış ve uygun bir transport yöntemleri ile laboratuvara getirilmiş örneklerle yapılabilir. Anaerop kültürlerde istenilen başarıyı elde edebilmek için laboratuvarlar ve klinikler arasındaki haber verme/reddetme sisteminin önemi büyüktür [9]. Klinik örneğin uygun koşullarda alınması ile anaeroplara neden olduğu enfeksiyonların mikrobiyolojik tanısı başlar [3, 8, 20, 31, 32]. Cilt komşuluğu ve çevre dokular nedeniyle flora ile kontamine olmuş materyallerin tanıda bir değeri yoktur. Derin cilt dokularından ve mukoz membranlardan örnek alınırken yüzey ile kontaminasyondan kesinlikle kaçınılmalı gerekmektedir. Cilt yüzeyi %10'luk povidon iyot ile temizlenmelidir. Sonrasında ise 1 dakika %70'lik etil alkol yada izopropil alkol kullanılarak povidon iyot uzaklaştırılıp alkolün kuruması beklenmelidir [23].

2.8.2 Örneğin Alınması

Klinik örneklerden anaerop bakterilerin izole edilebilmesi ve doğru tanının konulabilmesi için uyulması gereken diğer kural örneğin doğru yöntemlerle alınmasıdır. Öncelikli olarak, alınan örneğin oksijen ile temasın önlenmelidir. Genel anlamda ciltten ve müköz membranlardan örnek almadan önce, yüzeye dekontaminasyon işlemi yapılmalıdır. Bu nedenle öncelikle örnek alınacak yüzeyin merkezinden dışarı doğru sirküler hareketlerle 2 dakika kadar %10'luk povidon iyot (betadin) uygulaması yapılmalı ve sonrasında %70'lik etil alkolyada izopropil alkol ile temizlenmelidir. Bazı hastalarda iyot tentürüne alerjik reaksiyon gelişebileceği için örnek alımından sonra iyotlu bölgeyi alkolle temizlemek önemlidir.

Anaerop kültür için en ideal örnekler, enjektör ve benzeri aletlerle alınan örneklerdir. Ayrıca doku ve biyopsi örnekleri de anaerop kültürler için tercih edilebilir.

Eküvyonla alınan örneklerin az materyal içermesi, normal flora üyeleri ile kontaminasyon riskinin olması, bakterilerin pamuklu çubuğun liflerine yapışması ve bunların Gram boyama kalitesini düşürmesi gibi nedenlerle, mecbur kalınmadıkça eküvyonla örnek alınmamalıdır. Buna karşın yine de örnek almak gerekirse anaerop swap sistemi ile örnek alınabilir [23, 33].

2.8.3 Örneğin Nakli

Anaerop bakteriler oksijene karşı çok duyarlı olduklarından alınan örnek bekletilmeden, en hızlı şekilde, anaerop koşullara uyularak laboratuvara ulaştırılmalıdır [19].

Transport süresi alınan örneğin hacmine ve cinsine göre değişebilmektedir. Büyük hacimli ve pürülan olan örneklerde bulunan anaeroplara saatlerce canlı kalabilirken, küçük hacimli biyopsi örnekleri, aspirasyon materyalleri, sürüntü ve kazıntılar anaerop transport sistemleri ile taşınmalıdır. İşlemden gecikme olursa oda sıcaklığında bekletilmesi, ayrıca aşırı sıcak yada soğuğa maruz bırakılmaması

gerekir. Transport materyali olarak enjektör tercih edilmemelidir. Çünkü yaralanmaya neden olma riski ve dışarıya sızma tehlikesi bulunmaktadır [34].

Anaerop inceleme için alınan örneklerin, uygun transport besiyerleri içinde laboratuvara gönderilmesi, transport besiyeri yoksa hasta başında zenginleştirilmiş tioglikolat broth gibi sıvı anaerop besiyerlerine inokulasyonları önerilir [35]. Oda ısısı, örneklerin transportu için en uygun ısıdır. Çünkü oksijen düşük ısılarda örneğe daha iyi diffüze olur.

2.9 Anaerop Kültür İçin Kullanılan Besiyerleri ve Besiyeri Seçimi

Anaerop kültür yapılırken tercih edilecek besiyeri örneğin miktarına, cinsine ve laboratuvarın mali imkanlarına bağlı değişiklik gösterebilir.

Anaerop kültürler için üç tip besiyeri önerilmektedir [23]:

1. Selektif olmayan genel besiyerleri,
2. Selektif agar besiyerleri,
3. Zenginleştirilmiş- geri dönüş besiyerleri.

Selektif ve non selektif besiyerleri Tablo 6’da gösterilmiştir.

Tablo 6. Anaerop bakteri izalasyonunda kullanılan besiyerleri [14, 23]

SEÇİCİ OLANLAR	SEÇİCİ OLMAYANLAR
Cycloserine-cefoxitin fructose agar (CCFA)	Brucella kanlı agar
Kanamycin vancomycin kanlı agar (KVLB)	Beyin kalp infusion agar (BHIA)
Bacteroides bile esculin agar (BBE)	Tiyoglikolatlı buyyon
Phenylethyl alcohol agar (PEA)	Colombia kanlı agar
Colistin-nalidixic acid kanlı agar	Kıymalı glukozlu buyyon (Chopped meat glucose broth)
Egg yolk agar (EYA)	Fastidious anaerop agar (FAA)
Mobilincus agar	CDC anaerop blood agar
Anaerobe paromomisin vankomisin kanlı agar (PV)	Trypticase sodium agar (TSA)
Anaerobe phenylethyl alcohol blood agar (PEA)	Schaedler kanlı agar

2.9.1. Selektif Olmayan Genel Üretim Agar Besiyerleri

Nonselektif genel üretim agar besiyerleri anaerop bakterilerin ilk izolasyonunda kullanılan besiyerleridir. %5'lik koyun kanı, L-sistein, K1 vitamini ve hemin ile zenginleştirilerek kullanılır. Kullanılan agar çeşidi üretilmesi amaçlanan anaerop gruplara göre farklılıklar gösterir. Bunun için en az iki farklı baz agar ile hazırlanan besiyerlerinin kullanılması izolasyon oranını en üst düzeye çıkarmak için önerilmektedir [20].

2.9.1.1. Anaerop Kanlı Agar (CDC)

Amaç: Anaerop bakteriler için önerilen, zenginleştirilmiş genel üretim besiyeridir. Uygun anaerop şartlar sağlandığında anaeroplara, aerop ortamda ise pek çok bakterinin üretilmesi için uygundur.

Prensip: Bu besiyeri, hassas anaerop bakterilerin üremesini kolaylaştırmak için koyun kanı, vitamin K1, hemin, L-sistein ve maya özü ile zenginleştirilmiştir.[36].

2.9.1.2. Brucella Kanlı Agar (BA)

Amaç: Anaeroplara izolasyonunda kullanılan nonselektif besiyeridir.

Prensip: Hassas anaerobik bakterilerin üremesini arttırmak için defibrine koyun kanı, hemin ve vitamin K1 ilave edilen non selektif besiyeri haline getirilebilir. [36, 37].

2.9.1.3. Schadler Agar

Amaç: Aerobik ve anaerobik bakterilerin kültürü için kullanılan nonselektif besiyeridir. [36].

2.9.2. Selektif Agar Besiyerleri

Nonselektif besiyerlerinin beraberinde selektif besiyerlerinin kullanımı kültürün başarısını artırır. Örneklerin tek bir selektif besiyeri ile beraber selektif olmayan bir agara ekilmesi anaeroplara üremesini %77'den %94'e çıkarmaktadır [20].

2.9.2.1. Kanamisin-Vankomisin (KV) Hemolize Kanlı Agar

Amaç: *Bacteroides*, *Prevotella*, *Veillonella*, *Fusobacterium* türleri için selektif besiyeridir [23].

Prensip: Bu besiyeri, hassas anaeroplara üremesini arttırmak için koyun kanı, vitamin K1, hemin, maya özütü ve L-sistein ile zenginleştirilmiş bir besiyeridir. Gram(+) ve Gram(-) birçok bakteriyi inhibe eder. Geniş spektrumlu bir aminoglikozid olan kanamisin diğer aminoglikozidler gibi bakterilerde protein sentezini inhibe eder. Vankomisin ise hücre duvar sentezini engelleyerek Gram (-) ve Gram (+) fakültatif anaerop bakterilerin inhibisyonu sağlayan dar spektrumlu bir antibiyotiktir. *Prevotella*, *Bacteroides* ve bazı *Fusobacterium* türlerinin izolasyonunda önemlidir. KV kanlı agar, pek çok *Prevotella* türlerinin üremesini ve pigmentasyonunu sağlar. Ancak 7.5 µg/ml vankomisin konsantrasyonunda çoğu *Porphyromonas* türlerinin üremesini inhibe olur. Bu nedenle *Porphyromonas* spp. izole edebilmek için vankomisin konsantrasyonu azaltılmış (2 µg/ml) besiyeri hazırlanabilmektedir [10, 20, 31, 32, 36].

2.9.2.2. Bacteroides Safra Eskülin (BBE) Agar

Amaç: *Bacteroides fragilis* grubu (*Parabacteroides* spp. dahil) bakteriler ve *Bilophila* türleri için (*Bilophila wadsworthia*) seçici besiyeridir [23].

Prensip: BBE agar Hemin, vitamin K1 ve çeşitli enterik ve gram pozitif organizmaları inhibe eden %20'lik safra, gentamisin ve eskülin içerir. *B. fragilis* grubu mikroorganizmalar, *B. vulgatus*, *B. stercoris*, *B. pyogenes* hariç eskülini hidrolize eder ve koloniler BBE agarda kahverengi-siyah haleli siyah koloniler

oluştururlar. Eskülinin hidrolizi sonucu oluşan eskületin ve ferrik amonyum sitratın reaksiyonu ile koyu bir pigmentasyon oluşur.

Eskülini hidrolize edemeyen anaerop bakteriler bu besiyerinde koyu pigmentli üreme göstermezler. *Bilophila wadsworthia* H₂S üretir, soluk koloniler olarak siyah bir merkez etrafında görülür. Safra ise *Bacteroides fragilis* grubu dışındaki pekçok bakteriyi inhibe eder [10, 20, 23, 31, 32, 36, 38].

2.9.2.3. Anaerop Fenil-Etil Alkollü (PEA) Agar

Amaç: Enfekte materyallerdeki yoğun bakteri kompleksinden anaerop bakterilerin selektif izolasyonu amaçlanır. Çoğu gram pozitif ve gram negatif zorunlu anaeroplara üremesi için iyi bir besiyeridir. Stafilokoklar, streptokoklar, *Bacillus* spp., korinebakterium gibi fakültatif anaerop gram pozitif bakteriler de bu besiyerinde iyi ürerler [23].

Prensip: *Proteus* türlerinin yayılmasının, *Enterobacteriaceae* 'nın çoğunluğu da dahil olmak üzere pekçok fakültatif anaerop gram negatif bakterilerin inhibisyonunu sağlar [23].

2.9.2.4. Yumurta Sarılı Agar (Egg Yolk Agar-EYA)

Amaç: Bu besiyeri, bazı aerop ve anaerop mikroorganizmaları lesitinaz, proteaz ve lipaz aktivitelerine göre ayırt etmede tavsiye edilen bir besiyeridir. Eğer Gram boyamada yada klinik olarak *Clostridium* enfeksiyonu ön tanısı varsa, lipaz ve lesitinaz aktivitesine bakılarak anaeroplara grup bazında hızlı identifikasyonu yapılır [10, 31, 32, 36].

Prensip: Üç majör enzimatik aktivite, bu besiyerinde kullanılan yumurta sarısına bağlı olarak araştırılabilir. Lipaz aktivitesi, koloni etrafında yada yüzeyinde gökkuşağına benzer bir parıltı oluşturmasıyla anlaşılır. Besiyerindeki üreme alanında opak bir zon olarak lesitinaz aktivitesi gözlemlenir. Proteaz aktivitesi ise üreme

bölgesi dışına taşan saydamlık olarak gözlenir. Böylece bu enzimatik aktivitelerden bir yada birkaçına sahip mikroorganizmalar tespit edilebilir.

2.9.2.5. Sikloserin-Sefoksitin-Fruktoz Agar (CCFA)

Amaç: Gaitadan yada diğer intestinal materyallerden *C. difficile* 'nin selektif izolasyonu için kullanılır. Fakat bunun yanında CCFA agarda *C. difficile* dışında *Enterobacteriaceae*, *Bacillus* spp., stafilokoklar ve diğer klostridyumlar gibi üreyebilen başka bakteriler de olabildiği için ilk üremede saf kültür elde edilemeyebilir.

Prensip: *C. difficile* kolonileri uzun dalga UV ışığı altında CCFA üzerinde sarı-yeşil fluoresans verirler. Ayrıca kokusu da at gübresi kokusuna benzer. *C. difficile* 'nin lipaz ve lesitinaz aktiviteleri negatiftir [23].

2.9.3. Geri Dönüş Sıvısı

2.9.3.1. Zenginleştirilmiş Tiyoglikolat Broth

Amaç: Tiyoglikolat broth, serum, vitamin K1 ve hemin gibi maddelerin eklenmesiyle zenginleştirilir. Aerop ve anaerop pekçok bakteri çeşidinin izole edilmesi için kullanılır. Plağa ekilen örnekte bakteri sayısı az olduğunda, gram boyama anaerop enfeksiyonu düşündürmesine rağmen kültürde üreme olmadığında tekrar kültür için bakterilerin zenginleştirilmesini sağlayan geri-dönüş sıvısıdır [20, 36].

Prensip: Tiyoglikolat sıvı besiyeri protein, sodyum klorür, sodyum tioglikolat, glukoz, indirgen maddeler ve agar içerir. Anaerop mikroorganizmaların izolasyonu için ek maddelerle besiyerinin zenginleştirilmesi tavsiye edilir. Eklenen maddeler thioglycolate, sodyum sülfat, agar ve L-sistein ortamın oksidasyon-redüksiyon potansiyelinin düşmesine ve sabit kalmasına yardımcı olur. Böylece birçok anaerop bakteri gelişebilir.

2.9.3.2. Etli-glukozlu besiyeri

Amaç: *Clostridium* türlerinin izolasyonu için zenginleştirilmiş tioglikolat broth'un yerine alternatif olarak kullanılır [39].

2.10. Örneklerin İşlenme Prosedürü

2.10.1 Makroskopik İnceleme:

Nekrotik doku, pis koku, kan, püy yada sülfür granüllerinin varlığı incelenerek gelen örneğin kalitesi hakkında ön fikir elde edilebilir [34].

2.10.2. Örneğin Hazırlanması:

Pürülan olan örnekler vortekslenerek mikroorganizmaların homojen şekilde dağılması sağlanır. Dokular yada parça şeklinde gelen örnekler sıvı besiyeri (Tiyoglikolat, kıymalı buyyon vb.) içerisine eklenerek homojenize edilir. Büyük hacimli ve pürülan olmayan örnekleri ise yoğunlaştırmak için santrüfuj yöntemi kullanılmalıdır [34].

2.10.3. Gram Boyama:

Anaerob bakteriyoloji için Gram boyama hızlı ve önemli bir yöntemdir. Bu yöntemle incelenen örnekteki mikroorganizmaların ön tanımlaması yapılabilir ve bu inceleme ile besiyeri tercihi için fikir edinilebilir. Gram boyama anaerob enfeksiyon düşünülen her örnekten hazırlanmalıdır. Bu yöntemle karakteristik morfolojideki anaerob bakteriler incelenebilir. Gram boyamadaki fiksasyon basamağı için preparat, alevden geçirilmek yerine 30 saniye metanol ile fikse edilmelidir. Metanolla tespit, bakteri hücre morfolojisinin bozulmamasını ve daha iyi görünmesini sağlamaktadır. Zıt boyamada ise sulu fuksin yerine safranin tercih edilmelidir. Akridin oranjla boyandığında, kanlı sıvı yada eksüda vb örneklerden hazırlanmış kalın tabakalı preparatlardaki mikroorganizmalar daha iyi görülür. Gram boyama ve akridin oranj

boyamanın yanı sıra Giemsa ve Wright yöntemiyle de boyalı preparatlar hazırlanabilir. Anaerop mikroorganizmaların direkt mikroskopik incelenmesi için faz- kontrast ve karanlık saha mikroskopları da kullanılabilir. Yapılan incelemede:

1. *Clostridium* cinsi bakterilerin morfolojisinin ve sporlarının incelenmesi,
2. *Campylobacter* cinsi bakterilerin hareketinin incelenmesi,
3. *Dialister pneumosintes* gibi iyi boyanmayan ve küçük bakterilerin görülmesi,
4. Kültürü yapılamayan anaerop spiroketlerin morfolojilerinin gözlemlenmesi

sağlanır.

Direkt makroskopik ve mikroskopik inceleme, primer ekim için besiyerlerinin seçilmesi konusunda mikrobiyoloji uzmanlarını yönlendirmektedir. [20, 27, 32].

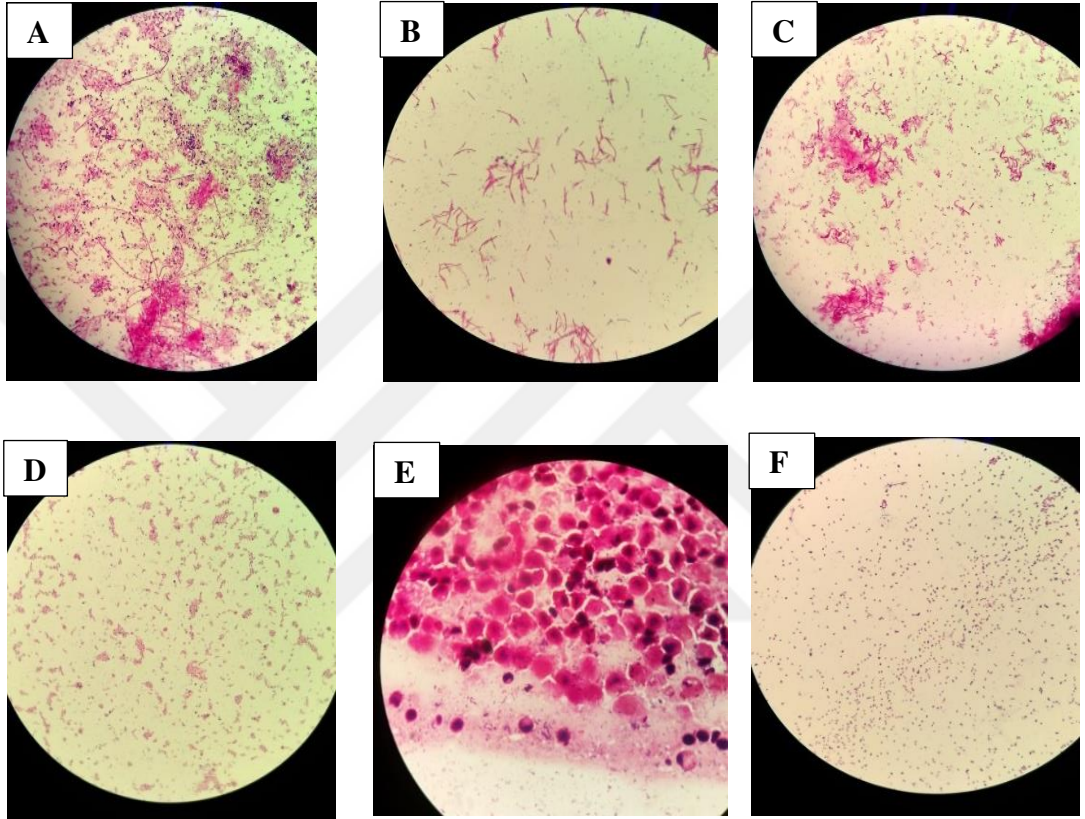
Gram boyama sonucu pozitif, kültür sonucu negatif olduğu durumda; yanlış transport yöntemleri, örnek işlenirken oksijen ile temas süresinin fazla olması, eski besiyerinin kullanılması, anaerop atmosfer oluşturan sistemin yetersizliği veya antibiyotik kullanımı düşünülür [40].

Tablo 7: Anaerop bakterilerin gram boyama ile morfolojik görünümüne göre ön tanısı [19, 23]

GRAM NEGATİF BASİL	GRAM NEGATİF KOK	GRAM POZİTİF KOK	GRAM POZİTİF SPORSUZ BASİL	GRAM POZİTİF SPORLU BASİL
<i>Bacteroides</i> <i>Fusobacterium</i> <i>Dialister</i> <i>Bilophila</i> <i>Parabacteroides</i> <i>Porphyromonas</i> <i>Prevotella</i>	<i>Veillonella</i> <i>Megashaera</i>	<i>Finegoldia</i> <i>Anaerococcus</i> <i>Atopobium</i> <i>Peptococcus</i> <i>Peptostreptococcus</i> <i>Peptoniphilus</i>	<i>Actinomyces</i> <i>Atopobium</i> <i>Bulleida</i> <i>Bifidobacterium</i> <i>Eubacterium</i> <i>Eggerthella</i> <i>Lactobacillus</i> <i>Propionobacterium</i> <i>Mobilincus</i>	<i>Clostridium</i> <i>Filifactor</i>

Resim 1: Bazı anaeropların gram boyama görüntüleri(Çalışmamızdan)

- A: Gram negatif uzun fusiform basiller, gram pozitif ve negatif koklar
B: Gram negatif basiller
C: Gram negatif kokobasiller
D: Gram negatif kok
E: Bol polimorfonükleer lökosit, gram negatif kokobasiller
F: Gram pozitif koklar



2.10.4. Ekim ve İzolasyon Planı

Anaerop enfeksiyonların genellikle polimikrobiyal olması, alınan materyalin endojen flora ile kontaminasyon ihtimali, örneğin oksijenle temas etmeden hemen laboratuvara ulaştırılma gerekliliği, anaerop mikroorganizmaların yavaş üremeleri, saf kültür elde etmedeki zorluklar ve tanımlama testlerinin zaman alıcı ve pahalı olması anaerop kültür yöntemlerinin temel zorluklarıdır. Buna karşın anaerop bakterilerin tanısında esas olan, kültür için gelen materyalin hemen ekiminin

yapılmasıdır. Katı besiyerlerine pürülan olmayan örnekten 2-3 damla, pürülan örnekten 1 damla, sıvı besiyerlerine 0.5-1.0 ml ekilir [34].

Gelen her klinik örneğin %5 koyun kanı, hemin (5 µg/mL) ve vitamin K1 (1 µg/mL) ile zenginleştirilmiş genel üretim besiyerlerine [Brucella agar, CDC (Centers for Control Disease) anaerop kanlı agar gibi] ekimi yapılır [2, 41].

Geri dönüş sıvısına tüm örnekler alınmalıdır. Ekimi yapılan plaklar 35-37°C’de 48 -72 saat inkübe edilir. Besiyerleri ilk 48 saatte açılmamalı ve oksijene maruz bırakılmamalıdır. Anaerop bakteriler logaritmik faz denilen en hızlı çoğalma dönemlerinde oksijene çok daha fazla hassastırlar. [23, 40] Klinik laboratuvarlar için anaerop inkübasyon sistemlerinin en yaygın ve en pratik olanları anaerop kabin, anaerop kavanoz ve anaerop plastik posetlerdir. Bu sistemlerin seçiminde maliyet, kültür sayısı gibi faktörler önemlidir [34, 42].

48-72 saatlik inkübasyon sonrasında bir büyüteç veya stereoskopik mikroskopla üreyen koloniler incelenir [20]. Besiyerinde üreyen ve anaerop olduğundan şüphelenilen her bir koloninin iki ekim olacak şekilde pasajı yapılır. Plaklardan biri CO₂’li ortamda, diğeri anaerobik sistemde inkübe edilerek aerotolerans testi yapılmış olur.

Klinik materyalden buraya kadar yapılan makroskopik ve mikroskopik inceleme ile materyalin kültürünün yapılması işlemlerinin hepsine Seviye 1 identifikasyon işlemleri denilmektedir. Aerotolerans testi ile anaerop olduğu kesinleşen bakterilerin identifikasyonu için bakteri Seviye 2 tanımlama testlerine alınır.

Kültür sonrası izole edilen bu bakterilerin saf kültürleri yapılarak daha ileri seviyede (Seviye 3) identifikasyonları yapılmak üzere referans laboratuvarlarına gönderilmelidir [41, 43].

2.11. Anaerop Kültürde Kullanılan İnkübasyon Sistemleri

2.11.1. Anaerop Kabinler:

Anaerop kabinler, %80-90 N₂, %5-10 CO₂ atmosfer ortamı sağlayarak anaerop ortam oluştururlar. İdeal anaerop inkübasyon sistemleridir. Anaerop kültür işlemi, inkübasyon, tanımlama, antibiyotik duyarlılık çalışmalarının yapılabilmesi ve besiyeri hazırlanması için ideal sistemlerdir. Anaerop kültürün az miktarda yapıldığı mikrobiyoloji laboratuvarlarında başka sistemler tercih edilmelidir [42].

2.11.2. Anaerop Jar Sistemi:

Anaerop kavanoz sistemlerinde de anaerop kabinlerdeki gibi %80-90 azot, %5-10 CO₂, %5 H₂ gaz karışımı kullanılır. Susuz yada su ile aktive olan anaerop ortam oluşturan sistemler bulunmaktadır. Kuru sistem için katalizör gerekmezken, diğer sistem için paladyum katalizörünün ortamda bulunma şartı vardır [42].

2.11.3. Anaerop Plastik Poşet:

Bu sistemin en büyük avantajı anaerop ortam bozulmadan üreme olup olmadığının gözlenebilmesidir. Bunun yanında anaerop poşetler transport amaçlı da kullanılabilir. Genel olarak %10'dan daha yüksek oranda CO₂'li ortam sağlanır. Metilen mavisi yada resazurin ile anaerop ortam denetlenebilir [34] .

2.11.4. Roll T p Sistemi:

Bu sistem için kullanılan PRAS (Pre-reduced Anaerobically Sterilized) sisteminde tüm işlemler anaerop gaz akımı ortamında yapılabilmektedir. Bu nedenle klinik materyal ve izole edilebilen bakteri oksijenin zararlı etkisinden sürekli olarak korunabilmektedir. Bu sistem oksijene çok hassas anaeroplara için kullanılışlıdır ve öncelikle amacı araştırma olan laboratuvarlarda tercih edilmektedir.

2.12. Kùltürlerin İncelenmesi ve Değerlendirilmesi

Kùltür değerlendirilirken üreme olan plaklarda beş yada daha fazla farklı bakteri kolonisi görölüyorsa, bunların tanımlanmasının tedavi açısından hekime bir faydası olmayacağı için, sonucun ‘karışık flora’ olarak raporlanması uygun olacaktır.

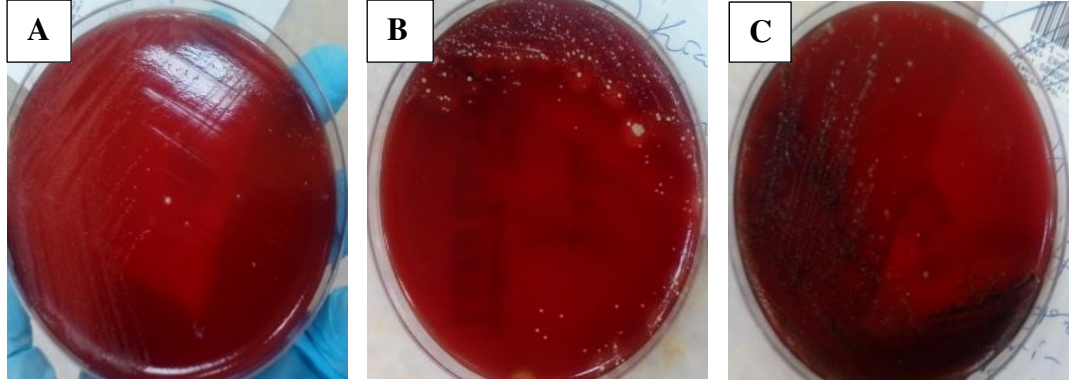
Fakat ‘*Bacteroides fragilis* grubu’ gibi önemli ve pekçok antibiyotiğe dirençli bir suş baskın şekilde ürediğinde tanımlama yapmak gerekebilir. İki yada daha fazla farklı anaerop bakteri üremesi olduğunda, aerotolerans testi yapılarak, zorunlu anaerop olup olmadıklarına karar verilip değerlendirme yapılır. Gram boyamaları değerlendirilerek ‘anaerobik gram-negatif kok’ gibi kısmi tanımlamaları yapılabilmektedir. Bunun yanında Gram boyamada *Clostridium* yada *Fusobacterium* türlerine spesifik bir görünüm varsa bu inceleme ön raporda bildirilmelidir. Bu şekilde tam tanımlanma yapılmadan bile kısmi bir ön raporlama, kompleks bir enfeksiyona sebep olan anaerop bakterilerin tedavisinde klinisyene anlamlı ölçüde yol gösterebilecektir [10].

Ayrıca kùltür plakları incelenirken kolonilerin morfolojisi, rengi, kokusu, pigment oluşturunp oluşturmamaları, oluşmuş pigmentlerin renkleri, kolonilerin parlak, mat, hemolizli ve şeffaf olup olmaması, agarda çukurlaşma yapması, UV ışığı altında floresans verme özellikleri değerlendirilmelidir. Bunlara bakılarak yapılan değerlendirme yapılırken tanımlama kriterlerinden en önemlileri ve ön tanıları Tablo 8’de belirtilmiştir.

Tablo 8: Anaerop bakterilerin koloni özelliklerine göre muhtemel tanısı [14, 23]

KOLONİ ÖZELLİĞİ	ÖN TANI
Renk/ pigment Pembe, kırmızı, sarı, ten rengi Sarı, ten rengi Kahverengi, siyah Pigmentsiz yada pigmentli Opak yada benekli koloniler	Gram pozitif kok: <i>Peptococcus niger</i> Gram negatif basil: <i>F.nechrophorumam</i> subsp.fundiliforme Gram negatif basil: <i>Porphyromonas spp.</i> Gram negatif basil : <i>Prevotella spp.</i> Gram negatif basil: <i>F.nucleatum</i>
Yoğunluk (şeffaf koloni)	Gram pozitif basil: <i>B. ureolyticus</i> , <i>Actinomyces naeslundii</i>
Koku Hoş olmayan tatlı kokusu At ahır kokusu	Gram pozitif kok: <i>Peptostreptococcus anaerobius</i> <i>Clostridium difficile</i>
Yayılan koloni	<i>C.tetani</i>
Agarı çukurlaştırma	<i>B.gracilis</i> , <i>B.ureolyticus</i> , <i>Wolinella spp.</i>
Çift zonlu hemoliz	<i>C.perfringens</i>
Örümcek ağı benzeri koloni	Gram pozitif basil: <i>P.propionicum</i> , <i>A.israeli</i> (genç koloni)
Sahanda yumurta görünümü	Gram negatif basil : <i>F.varium</i> , <i>F.mortiferum</i>
Azı dişi görünüşlü koloni	Gram pozitif basil: <i>P.propionicum</i> , <i>A.israeli</i> (yaşlı koloni)
Ekmek kırıntısı görünümlü	Gram negatif basil: <i>F.nucleatum</i>
Buzlu cam görüntüsü	Gram negatif basil: <i>F.nucleatum</i>
UV ışığında floresans verme Kırmızı Tuğla kırmızısı Açık yeşil	Gram negatif kok: <i>Veillonella spp.</i> Gram negatif basil: <i>Prevotella spp.</i> , <i>Porphyromonas spp.</i> Gram negatif basil: <i>F.nucleatum</i> , <i>F.nechrophorumam</i> subsp.fundiliforme Gram pozitif basil: <i>C.difficile</i>

Resim 2: Bazı anaeropların ana plak görüntüleri (Çalışmamızdan)



A: Hemoliz yapmış, beyaz, şeffaf koloniler

B: Hemoliz yapmış, beyaz, opak koloniler

C: Mikst enfeksiyon gösteren anaerop plak görüntüsü, en az 3 farklı bakteri kolonisi görülüyor: siyah pigment yapmış, parlak ve küçük koloniler

2.13. Anaerop Bakterilerin Tanımlanması

Anaerop mikroorganizmaların konvansiyonelyöntemlerle tanımlanmaları maliyetli ve zaman alıcıdır bu yüzden her mikrobiyoloji laboratuvarıkendi bütçesine göredeğerlendirme yapmalıdır. Anaerop mikroorganizmalar için yapılanidentifikasyon testlerine göre Seviye 1, Seviye 2 ve Seviye 3 olarak tanımlama seviyeleri tanımlanmıştır. Laboratuvarlar kendi imkanlarına göre farklı seviyelerde anaerop bakteriyoloji seviyesini kurabilir [41, 43].

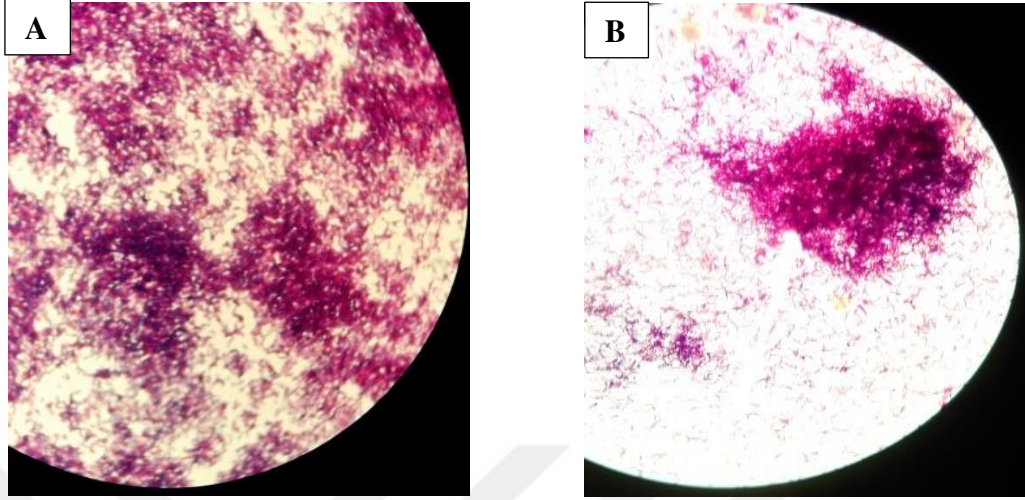
2.13.1. Seviye 1 İdentifikasyon

Bu tanımlama düzeyinde kültürdeüreyen anaeropların Gram boyanması, saf olarak pasajlanması, besiyerlerindeki koloni görünümlerinin yorumunu içermektedir [43, 44]. Anaerop mikroorganizmaların bu şekilde cins seviyesinde tanımlamalarının yapılabilmesi için belli konsantrasyonda antibiyotik içeren disklerle identifikasyonu gereklidir [27].

Resim 3: Saf Kültürden yapılan Gram Boyama Görüntüleri (Çalışmamızdan)

A: *P. acnes* (Gram pozitif basil),

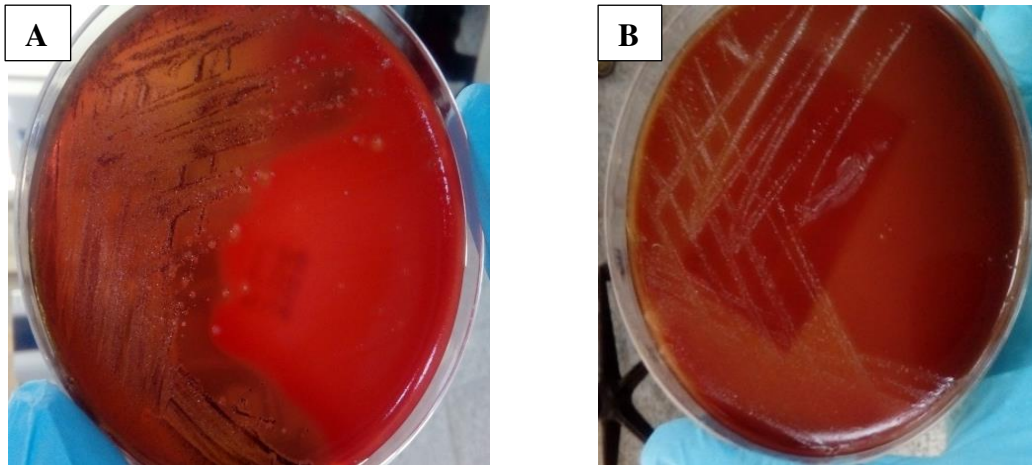
B: *Capnocytophaga sputigena* (Gram negatif basil)



Resim 4: Bazı anaeroplara ana plakları, koloni morfolojisi, pigment, hemoliz oluşumu (Çalışmamızdan)

A: Siyah pigment ve hemoliz yapmış koloniler

B: Beyaz opak ve beyaz hemolizli koloniler



2.13.2. Seviye 2 İdentifikasyon

Bu seviyede Seviye 1'e ek olarak katalaz, nitrat ve indol reaksiyonu, safraya olan direnç gibi basit biyokimyasal testlerle yapılır [27, 43]. Anaerob bakterilerin

tanısında kullanılan testler arasında karbonhidrat fermantasyon reaksiyonları, katalaz, eskülin hidrolizi, nitrat redüktaz (nitrat disk testi), safrada üreme varlığı, üreaz testi, lesitinaz ve lipaz reaksiyonları, DNA-az araştırılması, jelatin hidrolizi, hareket muayenesi, indol testi, toksin üretimi ve özel potense sahip antimikrobiyal disklerle duyarlılık sayılabilir. Disklerle yapılan identifikasyon Gram boyamayı destekleme ve ön gruplandırmaya yardımcı olur. Mikroorganizmanın antimikrobiyal duyarlılığını göstermez. Gram pozitifler kolistine dirençli, vankomisine duyarlı iken gram negatiflerin çoğu vankomisine dirençlidir [34, 42].

Tablo 9: İdentifikasyon diskleri ile anaerop bakterilerin ön tanısı [23, 27]

BAKTERİ CİNSİ	VANKOMİSİN (5MG)	KOLİSTİN (10MG)	KANAMİSİN (1000MG)
Gram pozitif	S ¹	R	V
Gram negatif	R ²	V	V
<i>Fusobacterium spp.</i>	R	S	S
<i>Porphyromonas spp.</i>	S	R	R
<i>Veillonella</i>	R	R	S
<i>Prevotella</i>	R	R	V
<i>B.fragilis grubu</i>	R	R	R
<i>B.ureolyticus</i>	R	S	S

R: Dirençli, V: Değişken, S:Duyarlı

¹ Lactobacillus ‘un bazı türleri ve *Clostridium innocuum* türlerinin çoğu vankomisine dirençlidir.

² *Porphyromonas spp.* vankomisin sensitiftir.

90’lı yıllarda bazı anaerop gram negatif basillerin tanımlanmasında kullanılan konvansiyonel yöntemlerden bazıları Tablo 10’da gösterilmiştir:

Tablo 10: İdentifikasyon diskleri ile anaerop gram negatif basillerin ön tanısı

[45]

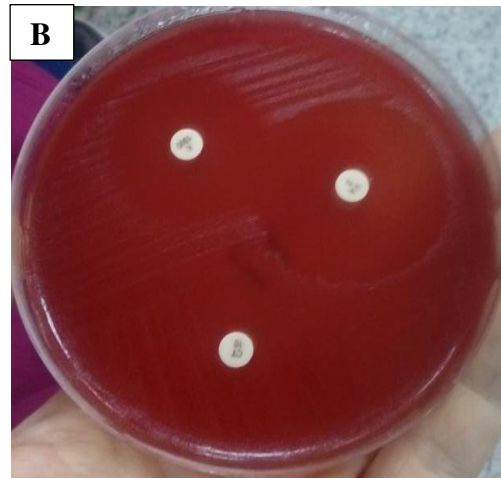
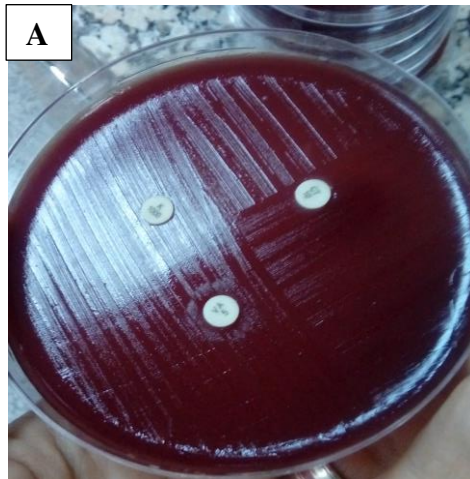
	Safra (5mg)	Antiseptik Anilin Boyası (100µg)	Kanamisin (1000µg)	Penisilin (2 U)	Kolimiksin (10µg)	Eritromisin (60µg)	Rifampisin (15µg)	Vankomisin (5µg)
<i>Bacteroides fragilis</i> grup	R	S	R	R	R	S	S	R
<i>Bacteroides melaninogenicus</i> grup	S	S	R	S	S/R	S	S	S/R
<i>Bacteroides oralis</i>	S	S	R	S	S/R	S	S	R
<i>Bacteroides corrodens</i>	S	S	S	S	S	S	S	R
<i>Fusobacterium mortiferum</i> , <i>Fusobacterium varium</i>	R	R	S	S/R	S	R	R	R
<i>Fusobacterium necrophorum</i>	S/R	R	S	S	S	S/R	S	R
<i>Fusobacterium nucleum</i>	S	R	S	S	S	S/R	S	R

S: Duyarlı R: Dirençli

Resim 5: İdentifikasyon diskleri ile tanımlama.

A: *B. fragilis* (MALDI-TOF sonucuna göre)-vankomisin, kolistin, kanamisin dirençli

B: *Actinomyces radingae* (MALDI-TOF sonucu)-vankomisin, kanamisin duyarlı, kolistin dirençli(Çalışmamızdan)



2.13.3. Seviye 3 identifikasyon

Anaerop enfeksiyonlarda etken olan anaerop mikroorganizmaların %50-75 kadarının tanımlamasının yapılabildiğini, %27'sinin ise tanımlanamadığını son yıllardaki çalışmalar göstermiştir. Bunun esas nedeni anaerop mikroorganizmaların konvansiyonel yöntemlerle tanımlanmasındaki güçlüklerden ve taksonominin sık sık değişmesidir [46-48]. Bunların sonucunda günümüzde anaerop enfeksiyonların rutin tanısında moleküler yöntemler de yaygın bir şekilde kullanılmaya başlanmıştır. Günümüze kadar anaerop mikroorganizmaların tanısının doğru konulabilmesi için geliştirilen sistemlerden bazıları [43]:

1. Hızlı enzim belirleme sistemleri Rapid ID 32A, RapID ANAII, ANI Card-Vitek)
2. Küçültülmüş biyokimyasal sistemler (API, BBL Crystal Anaerobe, Sceptor Anaerobe)
3. Metabolik son ürünleri tespit eden analizler (metil ester analizleri, sitotoksite testleri, gaz-sıvı kromatografisi, serbest yağ asidi analizleri)
4. Enzim substratı taşıyan diskler (ROSC0 tablet)
5. Matrix-aracılı lazer desorpsiyon-kütle spektrofotometrisi (MALDI-TOF MS)
6. Nükleik asit prob tekniği ile Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) dir [49, 50].

2.14. Anaerop Bakterilerde Tedavi

Başarılı bir anaerop enfeksiyon tedavisi için uygun antimikrobiyal tedaviyi seçmek ve tedavi etmek gerekmektedir. Sıklıkla beraberinde apse drenajı ile ortamdaki bakterileri uzaklaştırmak, yabancı cisimleri elimine etmek, nekrotik dokunun debridmanı ve diğer cerrahi yöntemler uygulanması gerekmektedir. Önceleri çoğu anaerop bakterinin tahmin edilebilir bir antimikrobiyal duyarlılık paterni olduğu, sadece monobakteriyel enfeksiyonlarda identifikasyon ve çeşitli antibiyotikler için antibiyotik duyarlılık testleri yapılması gerektiği düşünülmüştür. Bu yaklaşımın yetersiz olduğu daha sonra anlaşılmıştır. Bazı antibiyotiklerin (örn: metronidazol, ampisilin sulbaktam, karbapenemler ve piperasilin tazobaktam) genellikle anaerop bakterilerin hepsine etkili olmasına rağmen; duyarlılıkları henüz

bilinmeyen ve tedavide kullanılabilecek çeşitli antibiyotikler bulunmaktadır. Pekçok anaerop bakteride klindamisin, tetrasiklin, sefoksitin, kloramfenikol, karbapenemler ve metronidazole direnç genleri bulunmuştur. İn vitro ortamda yapılan çalışmalarda da bu genin aktarılabildiği tespit edilmiştir. *B. fragilis* grubunun çoğu sefalosporinlere ve penisiline dirençlidir; ayrıca klindamisine de giderek artan bir direnç söz konusudur. *Lactobacillus* spp., *Propionobacterium* spp., *Actinomyces* spp., diğer gram pozitif anaerop bakteriler ve bazı anaerop koklar metronidazole doğal dirençlidir. Florokinolonların bazıları (özellikle moksifloksasin) önceleri anaeroplara karşı etkin olmasına rağmen bu antimikrobiyallere de hızlı bir şekilde direnç gelişmiştir. *Clostridium*'lara ve bazı anaerop gram negatif basillere karşı, ikinci ve üçüncü kuşak sefalosporinler, klindamisin, penisilin ve üreidopenisilinler etkili olabilir. Bu antimikrobiyallere karşı direnç oldukça fazla değişken olabilmektedir. Karbapenemlere karşı direnç anaeroplarda oldukça nadirdir [23].

Anaeroplara izole edilmesi ve identifikasyonu zaman alıcı olduğu için, genellikle klinisyenin antimikrobiyal duyarlılık sonuçlarını beklemeden ampirik tedaviye başlaması gerekmektedir. Bu yüzden, lokal bir hastanede tespit edilmiş yada literatürde bildirilen duyarlılık sonuçları, tedavi protokolleri ve klinisyenin tecrübesi tedavinin önemli ve ilk basamağını oluşturur.

Klinik olarak anlamlı anaerop bakterilerin antimikrobiyal duyarlılık paternlerinde anlamlı farklılıklar bulunmaktadır. Bu yüzden bu bakterilerin invitro duyarlılık test sonuçlarının bildirilmesi, yayınlanması ile uzun süreli tedavi gerektiren endokardit, tekrarlayan ve dirençli bakteriyemi, akciğer apsesi, pulmoner hipertansiyon, osteomyelit vb. ciddi enfeksiyonların tedavisinde yada ampirik tedaviye yanıt alınamayan enfeksiyonların tedavisinde yol gösterici olmaktadır.

Antimikrobiyal duyarlılık testi yapılması için diğer bir gerekçe de, anaerop veya aeroplara kaynaklı başka bir hastalıkta nadir yada yeni bir bakterinin saptanması ve tedaviye karar verebilmek için temel oluşturacak bariz bir klinik örnek olmamasıdır. Ayrıca anaeroplara konusunda deneyimli mikrobiyologların yeni piyasaya sürülen antimikrobiyallerin etkinliklerini araştırmak için de antimikrobiyal duyarlılık testi yapmaları teşvik edilmelidir. Diğer yandan öncelikle yerel, bölgesel ve ayrıca dünya çapındaki duyarlılık paternleri de takip edilmelidir.

Bazı anaerop bakterilerin virulans özellikleri ve bunun yanında çeşitli antibiyotiklere genellikle dirençli olmaları sebebiyle, antimikrobiyal duyarlılık testlerinin yapılması özellikle önemli olmaktadır. Bunlara örnek olarak; *Bacteroides fragilis* grubu, *Fusobacterium mortiferum*, *F.necrophorum*, *Bilophila*, pigmentli *Prevotella-Porphyromonas* grubu, diğer *Prevotella* spp. verilebilir [23].

Anaerobik koklar genellikle penisilinlere ve karbapenemlere (örn: imipenem, meropenem) duyarlı, geniş spektrumlu sefalosporinler, eritromisin, klindamisin ve tetrasiklinlere orta duyarlı ve tüm diğer aneroplarda olduğu gibi aminoglikozidlere dirençlidirler. Monomikrobik enfeksiyonlar için genellikle spesifik tedavi endike olsa da, anaerop enfeksiyonların çoğu polimikrobik olduğu için, anaerop ve aerop etkinliği olan geniş spektrumlu tedaviler daha çok tercih edilmektedir [19].

Aktimikoz tedavisi için lokalize absenin drenajı yada etkilenen dokunun cerrahi debridmanı ve uzatılmış antibiyotik tedavisinin kombinasyonu gerekmektedir. *Actinomyces*'ler genellikle penisilin, klindamisin, makrolid ve karbapenemlere duyarlıdır. *Actinomyces*'lerin çoğu metronidazole dirençliyen, tetrasiklinlerin değişken etkinliği bulunmaktadır. Uzamış (örn:4-12 haftalık) tedaviye rağmen düzelmemiş vakalarda drene edilmemiş odaktan şüphelenilmelidir. Yoğun doku dekstrüksiyonu olan vakalarda bile tedaviye yanıt genellikle iyidir. Ağız ve intestinal sistemin yaralanmalarında oral hijyenin iyi bir şekilde sağlanması, sürdürülmesi ve uygun antibiyotik profilaksisi bu çeşit enfeksiyonların azaltılmasına katkıda bulunabilir.

Propionobacterium spp. için eritromisin ve klindamisin gibi antibiyotikler kullanılabilir.

Laktobacillus spp.'ler vankomisine dirençlidir. Penisilin ve aminoglikozidlerin kombine tedavisi bakterisidal aktivite için gereklidir.

Ciddi anaerobik enfeksiyonları tedavi edebilmek için genellikle cerrahi ve antibiyotik tedavisinin beraber uygulanmasına gerek duyulmaktadır. Genellikle *B.fragilis* grubunun tüm üyeleri, çoğu *Porphyromonas* ve *Prevotella* türleri, ayrıca

bazı *Fusobacterium* izolatları β laktamaz üretmektedir. Bu enzimin varlığı bakteriyi pekçok sefalosporine ve penisiline dirençli kılmaktadır.

Gram negatif anerop basillerin tedavisinde en iyi antibiyotikler metronidazol, karbapenemler ve β laktam- β laktamaz inhibitörleri (ör: piperasilin tazobactam) dir. *Bacteroides* türlerinde plazmid aracılığı ile aktarılan klinmadisin direnci artmaktadır [19].

2.15. Anaerop Bakterilerde Antimikrobiyal Duyarlılık Testleri

2.15.1. Agar Dilüsyon

Günümüzde CLSI, rutin klinik mikrobiyoloji laboratuvarlarında anaeroplara çoğunluğu için antimikrobiyal duyarlılık testlerinden agar dilüsyon metodunu önermektedir. Fakat *B.fragilis* grubu için broth mikrodilüsyon metodu da alternatif olarak uygulanabilir.

CLSI M11-A8 (2012), %5 hemolize koyun kanı, 5 μ g/ml hemin ve 1 μ g/ml vitamin K1 ilavesiyle zenginleştirilmiş brucella agar kullanılarak yapılan agar dilüsyon yöntemini referans yöntem olarak belirtmiştir. Hazırlanan plaklara antimikrobiyal madde, stabil olmamasından dolayı (imipenem, klavulanik asit gibi) kullanılacağı zaman eklenmelidir. Bu yöntem pratik ve ekonomik olmamasına rağmen çeşitli laboratuvarların MİK (Minimum İnhibitör Konsantrasyonu) değerlerinin doğru bir şekilde karşılaştırılmasına olanak vermektedir [23, 51].

2.15.2. Broth Mikrodilüsyon

CLSI M11-A8 (2012)'de *B. fragilis* grubu bakteriler için tanımlanmış bir yöntemdir.%5 hemolize koyun kanı, 5 μ g/ml hemin ve 1 μ g/ml vitamin K1 ilavesiyle zenginleştirilmiş brucella broth kullanılır [23, 51].

2.15.3. Broth Disk Diffüzyon ve Elüsyon Testi

Broth disk elüsyon ve disk agar diffüzyon testleri eskiden kullanılmakta iken, duyarlılık sonuçları referans yöntem olan agar dilüsyon ile korelasyon göstermediği için anaerop bakterilerde rutinde kullanılmamalıdır [23, 51].

2.15.4. E-Test

Etest metodu güvenilir sonuçlar vermektedir. Pahalı bir yöntemdir. Saflaştırılmış bakteri kolonilerinden 0.5 Mc Farland ayarlanarak Brucella kanlı agar kullanılarak yapılır. Plaklar 35°C’de anaerop ortamda 48 saate kadar bekletilir. *B. fragilis* ve diğer hızlı üreyen anaeroplara için bu süre 24 saat olabilir. Değerlendirme yapılırken şerit ile eliptik inhibisyon zonunun kesiştiği nokta MİK değeri olarak kabul edilir. Tek çeşit anaeroplara için bu yöntem çok pratik ve başarılıdır. Fakat standart metodlarla karşılaştırıldığında bazı uyumsuzluklar olduğu anlaşılmıştır. Örnek olarak testin yapıldığı şartlar ve besiyeri kalitesinin metronidazol MİK değerini etkilediği bulunmuştur. Bundan korunmak için kullanılacak besiyerleri bir gece önceden anaerop ortama alınabilir [51].

Yapılan çalışmalarda antimikrobiyal duyarlılık testlerinin avantaj-dezavantajları ile bazı temel özellikleri Tablo 11 ve Tablo 12’de sunulmuştur [37]:

Tablo 11: Anaerop bakterilerle yapılan çalışmalarda duyarlılık test yöntemlerine ait karşılaştırmalar

Antimikrobiyal Duyarlılık Test Yöntemi	Kullanılan Besiyeri	İNOKÜLÜM	İNKÜBASYON SÜRESİ (SAAT)
Broth mikrodilüsyon	Zenginleştirilmiş Brucella broth	10 ⁶ hücre/ml (10 ⁵ / kuyucuk)	48
E test	Brucella kanlı agar	0.5 McFarland, eküvyonla besiyerine yayılır.	24-48
Agar dilüsyon	Zenginleştirilmiş Brucella kanlı agar	10 ⁵ hücre/alan	48

Tablo 12: Anaerop bakterilerle yapılan çalışmalarda duyarlılık test yöntemlerinin avantaj ve dezavantajları

KULLANILAN YÖNTEM	AVANTAJLARI	DEZAVANTAJLARI
Agar dilüsyon	Çok sayıda bakteri ve antibiyotik denenebilir. Referans yöntemdir.	Pahalı bir yöntemdir. Yoğun laboratuvar işlemleri.
Broth mikrodilüsyon	Çok sayıda antimikrobiyal ve izolat denenebilir. Ekonomik, ticari paneller mevcut.	Bazı cinsler iyi üremez. Donmuş panellerin içindeki besiyeri miktarı az.
E test	Nadir hasta suşları için uygundur. Doğru MİK değerleri.	Sürveyans çalışmaları için pahalı

Antimikrobiyal duyarlılık test yöntemlerinde kullanılan kalite kontrol suşlarına ait bilgiler aşağıda verilmiştir.

1. *B. fragilis* ATCC 25285 (Kullanımı agar dilüsyon ile sınırlıdır.)
2. *Bacteroides thetaiotaomicron* ATCC 29741 (Kullanımı agar dilüsyon ile sınırlıdır.)
3. *C. difficile* ATCC 700057 (Kullanımı agar dilüsyon ile sınırlıdır.)
4. *Eggerthella lenta* ATCC 43055 (Agar dilüsyon, broth dilüsyon ve E-test yöntemlerinde kullanılabilir.) [51].

2.16. β -Laktamaz Testi

β -Laktamaz testi, β -laktamaz üretimini saptamaya yarar, çok sınırlı bir bilgi sağlar ve sadece penisilin tedavisi düşünülüyorsa fayda sağlayabilir. Çünkü β -Laktam direncine neden olabilen farklı mekanizmalar da mevcuttur ve testin negatif olması bakterinin penisiline kesin duyarlı olduğunu göstermez. *B. fragilis* grubundaki bakteriler için bu test gerekli değildir. Çünkü tüm subtiplerinin β -laktamaz pozitif olduğu yada başka mekanizmalarla penisiline dirençli olduğu bilinmektedir. Anaerop

bakterilerin β -laktamaz enzimi üretimini araştırmak için, ticari olarak temin edilen, bir ucunda nitrosefin gibi kromojen bir sefalosporin süspansiyonu bulunan test çubukları kullanılmaktadır. β -laktamaz aktivitesi sonucu beta-laktam halkasının hidrolizi gerçekleşerek test çubuklarının ucu sarıdan kırmızıya dönüşür. Bu reaksiyon pozitif olarak değerlendirilir. Bu reaksiyon 5-10 dakika içinde gerçekleşirken, bazı *Bacteroides* türleri için 30 dakika gerekebilir [51].

2.17. Anaeroplardaki Antibiyotik Direnci

Tüm anaeroplarda trimetoprim- sülfametaksazol ve aminoglikozidlere dirençlidir. Kloramfenikol direnci çok nadirdir. Direnç nitroreduksiyon yada asetiltransferaza bağlı ilacın inaktivasyonundan kaynaklanır; kloramfenikolün hematopoetik sisteme toksik olduğu unutulmamalıdır.

2.17.1 Gram-Negatif Anaeroplarda

2.17.1.1 *Bacteroides Fragilis* Grup

B. fragilis grubunda 23 tür bulunmaktadır. *B. fragilis* genellikle bu grup üyeleri arasında antibiyotiklere en duyarlı olan tür olmasına rağmen, %95'inden fazlası sıklıkla β -laktamaz üretimine bağlı penisiline dirençlidir [51, 52].

Son 10 yılda duyarlılığı % 90'dan % 70'e düşmesine rağmen, piperasilin *B. fragilis* grubuna karşı en etkin üreidopenisilindir [52]. 1.jenereasyon sefalosporinler ve oksasilin ve nafsilin gibi penisilinaza dirençli penisilinler bu bakterilere etkili değildir. Piperasilin-tazobaktam, ampisilin-sulbaktam, tikarsilin-klavulanat ve amoksisilin-klavulanat gibi β -Laktam- β -laktamaz inhibitörleri *B. fragilis* grubu üyelerinin neredeyse tüm üyelerine karşı etkindir. Fakat, Taiwan'da yapılan çalışmalardan birinde *B. fragilis* ve *B. fragilis* grup üyelerinde %48 oranında ampisilin- sulbaktama direnç tespit edilmiş. Benzer şekilde, Avrupa'da yapılan bir çalışmada *Bacteroides* türlerinin %10'unda amoksisilin-klavulanat ve piperasilin-tazobaktamın her ikisine de direnç tespit edilmiştir [51].

Sefalosporinlerden sefoksitin ve sefotetan genellikle *B. fragilis*'e etkilidir [51, 53]. *Bacteroides* spp.'de dünya çapında klindamisine direncinin yaklaşık %40'larda olduğu bildirilmiştir. Karbapenemler (ertapenem, imipenem, doripenem ve meropenem), tinidazol, kloramfenikol ve metronidazol genellikle *B. fragilis* grup üyelerinin neredeyse hepsine etkindir bunun yanında imipenem ve metronidazole dirençli suşlar da tespit edilmiştir. Taiwan' da yapılan çalışmalardan birinde imipenem ve meropeneme direnç oranının *B. fragilis*'te % 7-12, *B. thetaiotaomicron*'da %3-7 arasında olduğu tespit edilmiştir [51].

B. fragilis grubuna ait türlerde ve diğer anaeroplarda dünya çapındaki yaygın kullanımı nedeniyle florokinolon direnci artmaktadır. 1994 yılında trovafloksasin anaerop enfeksiyonların tedavisi için kullanılmak istendiyse de toksisite endişesi nedeniyle kısa sürede piyasadan kaldırılmıştır. Moksifloksasin de intra-abdominal, cilt ve yumuşak dokunun anaerobik enfeksiyonlarında kabul görmüştür, invitro ortamda *B. fragilis* ve diğer anaeroplara çoğunaetkili iken, *B. thetaiotaomicron*' a zayıf etkilidir. Çok merkezli bir çalışmada (1997'den 2004'e), Snyderman ve ark. nın raporuna göre: *B. fragilis* 'lerin % 32'sinde, *B. thetaiotaomicron*'ların % 33'ünde, *B. ovatus*'ların % 39'unda ve *B. vulgatus* izolatlarının %56 'sında moksifloksasin direnci tespit edilmiştir. Diğer yandan, intraabdominal enfeksiyonlardan izole edilen hem *B. fragilis* hem de *B. thetaiotaomicron* izolatlarının %87'sinin moksifloksasine duyarlı olduğu bulunmuştur (2001-2004 arası). *B. fragilis* grup izolatlarının %86'sının (303/363) ve *Eubacterium*, *Porphyromonas*, *Fusobacterium*, *Prevotella*, *Clostridium perfringens* ve *Peptostreptococcus* türlerinin aralarında bulunduğu diğer anaeroplara 417/450'sinin ≤ 2 µg/ml'lık moksifloksasine duyarlı olduğu bulunmuştur. Taiwan'da yapılan çalışmalardan birinde nosokomial ve kanda izole edilen *B. fragilis*'lerin %90'sında, *B. thetaiotaomicron*'ların %87'sinde moksifloksasin duyarlılığı bulunmuştur [51].

Tigesiklinin CLSI yada EUCAST'te anaeroplara için tanımlanmış bir MIC değeri olmamakla birlikte FDA onaylı MIC (≤ 4 µg/ml) ile değerlendirme yapılabilmektedir ve invitro çalışmalarda pekçok anaerop türüne karşı etkin olduğu bulunmuştur [51, 52].

2.17.1.2 *Porphyromonas* ve *Prevotella*

Bu bakterilere ait duyarlılık bilgisi azdır fakat her ikisi de *B. fragilis* grubuna göre daha duyarlıdır. Amerika'daki *Prevotella* spp. suşlarının %50'sinde, Taiwan ve Avrupa'da ise %94'ünde β -laktamaz üretimine bağlı penisilin ve ampisiline direnç tespit edilmiştir. Yayınların çoğunda sefotetan, piperasilin ve sefoksitine %70-90 arası duyarlılık bulunmuştur. *Porphyromonas* spp. suşlarının %8'i β -laktamaz üretmekte, bu oran pelvik enfeksiyonlarda %17'ye çıkmaktadır. Klindamisin direnci çok az tespit edilse de *Prevotella* ve *Porphyromonas*'larda kloramfenikol, metronidazol ve karbapenemlere genellikle hepsi duyarlıdır [51].

2.17.1.3 Diğer Gram-Negatif Basiller

Fusobacterium nucleatum'da penisilin direnci gözlenmiştir. Çocuklarda antibiyotiklere maruz kalma ve beta laktamaz üretimi nedeniyle artan bir direnç söz konusudur. Genellikle *Fusobacterium* spp.'lerin %90'dan fazlası sefamisin ve sefalosporinlere duyarlıdır. *Bilophila wadsworthia* sıklıkla beta laktamaz üretmekte ve bu yüzden ampisilin ve penisiline dirençli olmakla birlikte, metronidazol, karbapenemler, sefoksitin, klindamisin ve beta laktam –beta laktamaz inhibitörü kombinasyonlarına genellikle duyarlıdır [51].

2.17.2 Gram-Pozitif Anaeroplara

2.17.2.1 Sporsuz Gram Pozitif Basiller

Actinomyces, *Propionibacterium*, *Eubacterium* grubu ve *Bifidobacterium*'lar genellikle penisilin, karbapenem ve sefalosporinler gibi β -laktam ajanlara ve β -laktam – β -laktamaz inhibitörü kombinasyonlarına duyarlıdır. *Lactobacillus* spp. sıklıkla penisilin ve ampisiline genellikle duyarlıdır. Anaeroplara için belirlenmiş bir vankomisin MIC değeri olmamakla birlikte, tüm *Propionibacterium* spp.'lere, *Eubacterium* grup türleri, *Actinomyces* spp., bazı *Lactobacillus* spp türleri ve anaerop gram pozitif koklara invitro ortamda etkinliğinin çok iyi olduğu bulunmuştur. Fakat *Lactobacillus casei* ve pekçok başka türlere karşı da düşük etkinliği vardır. Daptomisin, linezolid ve telavansin gibi gram pozitiflere etkin yeni ajanların anaerop

gram pozitiflere in vitro etksi mükemmeldir. Gram pozitif anaerop sporsuz basillerin çoğu metronidazole dirençlidir. Moksifloksasin *Actinomyces* türlerinin çoğuna etkilidir [51].

2.17.2.2 *Clostridium*

C. perfringens florokinolonlar vb çoğu anaerobik antimikrobiyallere duyarlı iken, *C. difficile*, *Clostridium clostridioforme* ve *Clostridium innocuum* klindamisin, beta laktamlar, ve florokinolonlara potansiyel direnç ile beraber farklı duyarlılık oranlarına sahiptir. Metronidazol ise etkilidir. *C. difficile*'nin tüm dünyada metronidazole ve vankomisine duyarlılığı devam etmektedir [51].

2.17.2.3 Gram-pozitif koklar

Gram pozitif koklar β -laktamlara, sefaolosporinlere, karbapenemlere, β -laktam- β -laktamaz inhibitör kombinasyonlarına, kloramfenikol ve metronidazole yüksek oranda duyarlıdır. Cilt ve yumuşak doku enfeksiyonlarından elde edilen izolatlarda florokinolon direnci ve bazı izolatlarda klindamsin direnci gözlenmektedir. Metronidazol dirençli anaerobik kok tespit edildiğinde metronidazole her zaman dirençli olarak bilinen *Streptococcus anginosus* ile karışabileceği akılda tutulmalı ve tanımlamanın doğru olup olmadığı kontrol edilmelidir [51].

3. GEREÇ

3.1. Kullanılan Besiyerleri, Kitler ve Cihazlar

3.1.1. Brucella Kanlı Agar (BA)

Anaeroplari izole edebilmek için temel besiyeri olarak kullanıldı. Ayrıca anaerop bakterilerin üremesini arttırmak için hemin, vitamin K1 ve defibrine koyun kanı ilave edildi.

İçeriği:	Brucella broth	1000 ml.
	Agar	2.5 gr.
	Hemin stok solüsyonu	1 ml.
	Vitamin K1 solüsyonu	1 ml.

Hazırlanışı: Hemin ve vitamin K1 stok solüsyonları hazırlandı. 20 ml. %95'lik etanol içinde 0.2 gr. vitamin K1 çözülerek (10 mg/ml) steril ve kapaklı şişelerde ışıktan uzakta ve soğukta saklandı. Stok hemin solüsyonunu hazırlamak için ise 0.5 gr. hemin 10 ml. NaOH içinde çözüldü ve hacmi 100 ml'ye tamamlandı. Temel besiyeri sıcak su banyosunda ısıtılarak eritildi ve 121 °C'de 15 dakika otoklavlanarak steril edildi. 50°C'ye kadar soğutuldu. Temel besiyerine aseptik koşullarda %5 defibrine koyun kanı, 1 ml. vitamin K1 ve 1 ml. hemin solüsyonu ilave edildi. 20'şer ml olacak şekilde plaklara dağıtıldı ve 4-6 °C'de saklandı.

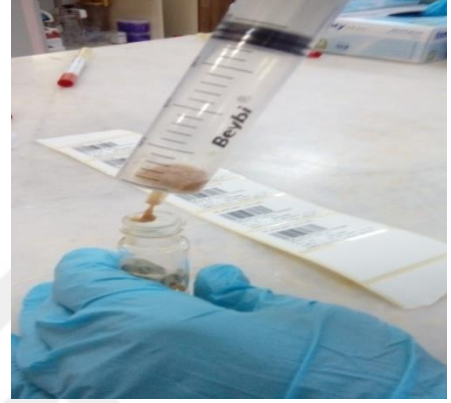
3.1.2. Zenginleştirilmiş tioglikolat besiyeri

İçerik:	Triptikaz	15 gr.
	Resazurin	0.001 gr.
	Dekstroz	5.5 gr.
	Maya zeti	5 gr.
	L-sistein	0.5 gr.
	Sodyum klorid	2,5 gr.
	Sodyum tioglikolat	0.5 gr.
	Agar	0.75 gr.

Hazırlanışı: 29,8 gram içerik, 1 ml. hemin solusyonu, 1ml. vitamin K1 ve 1gr. sodyum bikarbonat 1 litre distile suda çözüldü ve final pH'ı 7.1 olarak ayarlandı. Eriyene kadar ısıtıldı (1 dakika). 121 °C'de 15 dakika otoklavlanarak steril edildi. 18

ml.'lik steril cam tüplere dağıtılarak, karanlık bir ortamda, oda ısısında muhafaza edildi.

Resim 6: Örneklerin tiyoglikolatlı buyyona alınması (Çalışmamızdan)



3.1.3. Skim Milk

Hazırlanışı: 250 ml. distile su içinde 25 gr. skim milk içeriği çözüldü. Ependorf tüplere 1 ml dağıtıldı. 121 °C'de 5 dakika otoklavlanarak steril edildi.

3.1.4. MALDI-TOF MS

Çalışmaya aldığımız ve MALDI- TOF ile tanımladığımız tüm anaerop bakteriler Brucella agara pasajlandı, 48 saatlik saflaştırma pasajlarından sonra koloni morfolojisi açısından MALDI - TOF ile identifikasyonu şüpheli olan koloniler yada MALDI - TOF ile sarı ve kırmızı renkte identifiye edilen koloniler tekrar MALDI-TOF sistemi ile tanımlandı. Taze kültürlerden 1-2 koloni alınarak maldi plağındaki (96 örneklik paslanmaz çelik tekrar kullanılabilir örnek uygulama plakası) noktasal bölgelere konuldu, örneklerin üzerine 1µl formik asit çözeltisi eklendi ve kurumaları için oda sıcaklığında bekletildi daha sonra örneklerin üzerine 1µl matriks çözeltisi

(Bruker Daltonics GmbH HCCA Matriks=siyano 4 hidroksisinnaminik asit) eklendi ve yine oda sıcaklığında kurutuldu. Matriks, örnek moleküllerinin iyonlaşması için gerekli enerjinin lazer ışığından örnek moleküllerine iletilmesini sağlayan bir aracı olarak düşünülebilir. Çalışmamızda MALDI-TOF-MS sistemi olarak Bruker Daltonics Microflex LT sistemi kullanıldı ve ölçümler üretici firmanın önerdiği ayarlarla yapıldı. 2-20 kDa kütle aralığında, pozitif lineer modda, 337 nm Nitrojen lazeri ile iyonlar oluşturuldu. Elde edilen spektrumlar MALDI Biotyper Otomasyon Kontrol ve Bruker Biotyper 3.1 yazılımı (Bruker Daltonics, Bremen, Germany) kullanılarak analiz edildi. İdentifikasyondan önce örnek uygulanan MALDI plakasının BTS (Bakteriyel Test Standardı) kullanılarak kalibrasyonu yapıldı, analiz validasyonu sağlandı.

Bizim analizimizde kullandığımız tanımlama kriterleri, üretici firmanın önerdiği şekilde aşağıdaki tabloda özetlenmiştir:

Tablo 13: MALDI-TOF skor değerlerinin anlamı [54]

SKOR ARALIĞI	YORUM	SEMBOLLER	RENK
2.300- 3.000	Yüksek olasılıklı tür tanımlaması	(+++)	Yeşil
2.000-2.299	Muhtemel tür, güvenilir cins tanımlaması	(++)	Yeşil
1.700-1.999	Muhtemel cins tanımlaması	(+)	Sarı
1.000-1.699	Güvenilir olmayan tanımlama	(-)	Kırmızı

Skor ≥ 2 ise tür düzeyinde güvenli tanımlama (A düzeyi ya da yeşil renk ile temsil ediliyor)

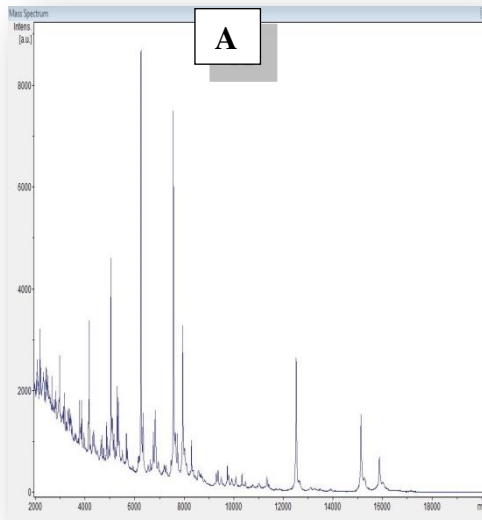
Skor 1.700-1.999 ise cins düzeyinde güvenli tanımlama (B düzeyi ya da sarı renk ile temsil ediliyor)

Skor <1.700 ise güvensiz sonuç (C düzeyi ya da kırmızı renk ile temsil ediliyor)

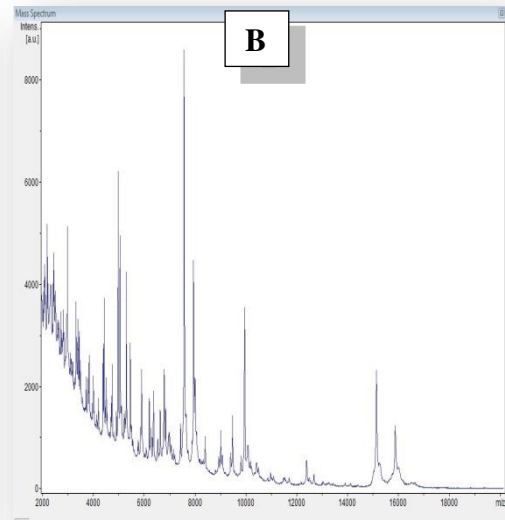
Resim 7: Çalışmamızda Kullandığımız MALDI-TOF MS cihazı



Resim 8: Bazı bakterilerin spektrum görüntüleri (Çalışmamızdan)



A: Fusobacterium nucleatum



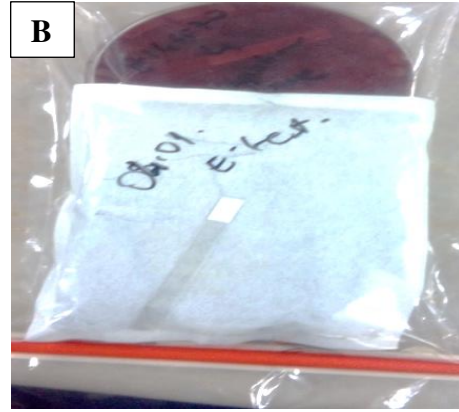
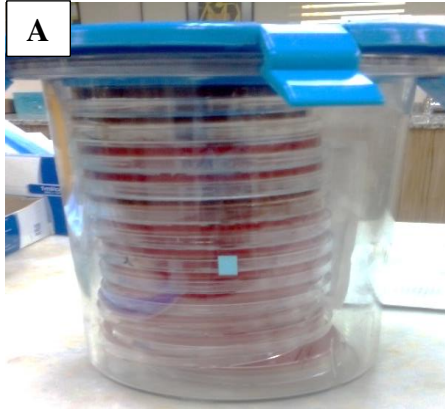
B: Dialister pneumosintes

3.2 Anaerobik İnkübasyon ve Denetlenmesi

Anaerop inkübasyon amacıyla anaerop poşetler, 2,5 lt'lik anaerop kavanozlar (jar) ve anaerop standart inkübasyon konteynır sistemler kullanıldı (BD GasPak™ EZ). Bunların içine ekim yapılan besiyerleri yerleştirildi. 2,5 lt'lik jarda anaerop ortam oluşturabilecek özellikte olan paketler (AnaeroPack™-Anaero Mitsubishi Gas Chemical, Japan) jarın içine bırakılarak jar hızlıca kapatıldı. Konteynır sistemler için bu paketlerden 2 tane kullanıldı. Anaerop ortamın oluşup oluşmadığını kontrol etmek amacıyla metilen mavisi emdirilmiş kâğıt stripler (Anerotest, Merck, Germany) dışardan gözlenebilecek şekilde jarın içine yerleştirildi. Bu stribin renginin maviden beyaza dönüşmesi durumunda anaerop ortamın oluştuğu düşünöldü. Eğer stripte renk değışikliğı 1-2 saat içinde oluşmamışsa yukarıda sayılan işlemler tekrarlandı. 37°C'de 48 saat inkübasyon yapıldı. Anaerop inkübasyon ve denetlenmesi Resim 9'da gösterilmiştir.

Resim 9: Anaerop inkübasyon ve denetlenmesi (Çalışmamızdan)

- A: Anaerop jarda oksijensiz ortam oluşmamasına rağmen (Strip mavi)
- B: Anaerop poşette anaerop ortamın oluşmuştur (Strip beyaz)
- C: Anaerop konteynır sisteminde anaerop ortam oluşmuştur (Strip beyaz)



4.YÖNTEM

4.1 Örneklerin Toplanması

Klinik örneklerden izole edilen anaerop bakterilerin konvansiyonel yöntem ve MALDI-TOF MS ile tanımlanması ve antibiyotik duyarlılıkları konulu çalışmaya, 01.04.2017-01.04.2018 tarihleri arasında DÜTF Hastanesi'nde çeşitli klinik birimlerden anaerop kültür istemiyle kültür laboratuvarımıza gönderilen 359 rutin klinik örnek alınmıştır. Çalışma için DÜTF Etik Kurulu'ndan 16.12.2016 Tarih ve Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu: 346 sayılı karar ile onay alınmıştır. Alınan klinik örnekler laboratuvarımıza ulaştırıldıktan sonra, çalışmanın geriye kalan kısmı tümüyle DÜTF Tıbbi Mikrobiyoloji AD. Bakteriyoloji laboratuvarında gerçekleştirilmiştir. Hastanemizde ticari olarak temin edilebilen anaerop transport sistemler mevcut olmadığından, kliniklere laboratuvarımız tarafından taze hazırlanan tioglikolat sıvı besiyeri verilmiş, laboratuvar personelimize de anaerop örneğin vakit kaybedilmeden hemen işleme alınması gerektiği hatırlatılmıştır.

4.2 Örneklerin İşleme Alınması

Steril cam tüplerle, steril plastik kaplarla ya da steril şırıngalarla laboratuvarımıza anaerop kültür için gönderilen tüm örneklerin öncelikle anaerop kültür için uygun örnek olup olmadıkları değerlendirildi. Uygun yöntemle alınmamış veya pamuklu svablarla alınmış anaerop kültür için uygun olmayan toplam 2 örnek kliniklere haber verilmek suretiyle işleme alınmadı. Kalan 357 klinik örneğin makroskopik (örneklerin pürülan, kanlı olması, kötü koku ve sülfür granülleri içermeleri gibi.) özellikleri ile gram boyanma özellikleri değerlendirildi. Gram boyamalarda anaerop bakteriler tipik morfolojik özellikleri, pleomorfik boyanma özellikleri ve spor içerip içermemeleri yönünden incelendikten sonra örnekler primer kültür plaklarına ekildi.

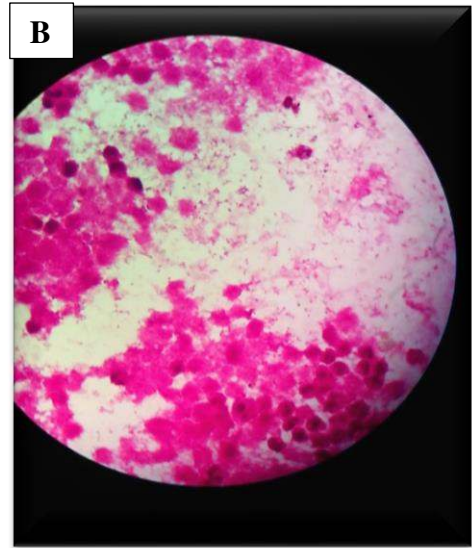
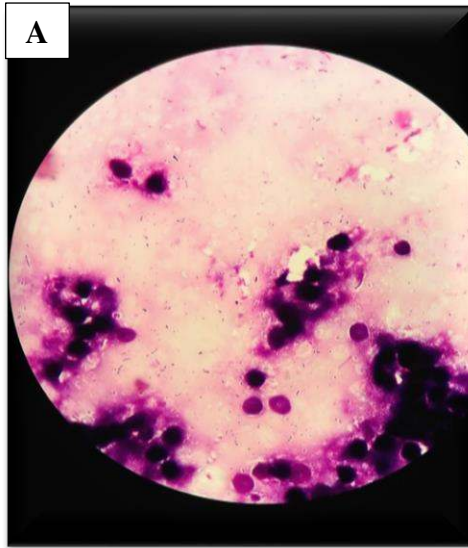
4.3. Kültür

Uygun olan örneklerin anaerop kültürü için brucella kanlı agara ekimleri yapıldı. Ayrıca örneklerin %1 hemin ve vitamin K1 ile zenginleştirilmiş, geri dönüş sıvısı için kullanılan tioglikolatlı buyyona ekimleri yapıldı. En iyi sonucu alabilmek için tiyoglikolatlı buyyon kullanılmadan önce ısıtıldı ve oda ısısına gelmesi beklendi. Gelen rneklerin Gram boyamaları yapıldı. Yaymaların fiksasyonu metanol ile (1dakika) yapıldı. Anaerop şartlarda ürediği görülen kolonilerin morfolojik görünümleri ve pigment oluşumu incelendi. Farklı görünümdeki bütün kolonilerin anaerop ve aerop pasajları yapıldı ve yukarıda anlatılan inkübasyon işlemleri uygulandı. Yalnızca anaerop ortamda üreyen koloniler identifikasyon işlemine tabi tutuldu. Katı besiyerlerinde anaerop sartlarda bakteri remediye, sıvı besiyerine yapılan ekim değerlendirildi ve dipte bulanıklık olduysa anaerop katı besiyerine ve aerop besiyerine pasajları yapılarak daha önce bahsedildiği şekilde inkübasyon yapıldı.

Resim 10: Bazı rneklerin Gram Boyama Görüntüleri (alışmamızdan)

A: Orta yoğunlukta polimorfonükleer lökosit ve gram negatif basil, gram pozitif kok, gram pozitif basil

B: Orta yoğunlukta polimorfonükleer lökosit ve gram negatif kok



4.4 İzole Edilen Mikroorganizmaların Tanımlanması

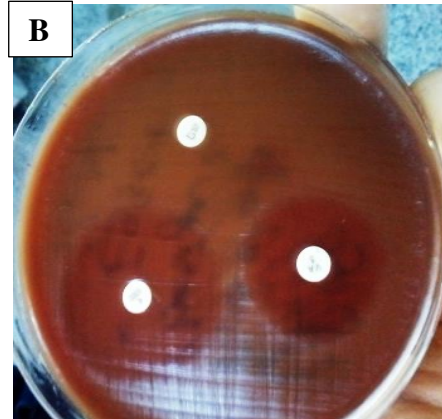
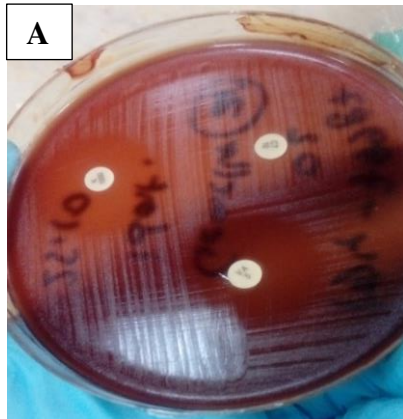
48-72 saatlik inkübasyon sonunda plaklar değerlendirildi. Anaerop plağında üreme olmadığı halde gram boyasında mikroorganizma görülen tüm örneklerin THIO geri dönüş sıvısından tekrar anaerop ekimi yapıldı. Anaerop ekim plaklarında üreme olmaması durumunda, geç üreyen anaerop bakteriler için inkübasyon süresi 5-7 gün kadar uzatıldı. İnkübasyon sonrası anaerop ortamda üreyen tüm koloniler MALDI-TOF MS ile tanımlandı. Tanımlanamayan koloniler çukolata agara pasajlanarak aerop ve anaerop ortamda ayrı ayrı inkübe edildi. Aerotolerans testi pozitif olanlar tekrar MALDI-TOF MS ve identifikasyon testleri ile tanımlandı. Bu işleme göre anaeroplara çoğu tür düzeyinde tanımlandı. Kalan kısmı identifikasyon diskleri ile cins düzeyinde tanımlandı. Antibiyotik tanı diskleri testi için kolistin (10 µg), kanamisin (1000 µg) ve vankomisin (5 µg) diskleri (Antimikrobiyal Duyarlılık test diskleri, Bioanalyse, Türkiye) kullanıldı.

Antibiyotik diskleri ile tanı için, buyyon içerisinde hazırlanan süspansiyon 0.5 Mc Farland bulanıklığına ayarlanıp steril pamuk silgiçler ile Brucella agar besiyeri yüzeyine sürüldü ve antibiyotik emdirilmiş kağıt diskler besiyeri yüzeyine yerleştirildi. 48 saat anaerop ortamda inkübasyondan sonra zon çapları cetvelle ölçülerek değerlendirildi. Zon çapı 10 mm'den büyük olan diskler duyarlı (S), 10 mm'den küçük olanlar ise dirençli (R) olarak değerlendirildi.

Resim 11: İdentifikasyon Diskleri ile tanımlama

A: *Gemella haemolysans* (Gram pozitif kok) (vankomisin ve kanamisine duyarlı, kolistine dirençli)

B: *Eggerthia cateniformis* (Gram pozitif basil) (vankomisin ve kanamisine duyarlı, kolistine dirençli)



4.5. İzole edilen anaerop bakterilerde antimikrobiyal direncin belirlenmesi

Çalışmamızda, ana plaklardan saflaştırma yapılarak pasajlanmış bakterilerin antimikrobiyal direncini belirlemek için kloramfenikol (Liofilchem, Italy), metronidazole (Liofilchem, Italy), penisilin G (Liofilchem, Italy) ve imipenem (Liofilchem, Italy) ve sefoksitin (Liofilchem, Italy) antibiyotikleri kullanılmıştır. E-test yöntemi kullanılmıştır ve MİK değerleri üretici firmanın önerisine göre sefoksitin için CLSI M 11-A6'nın, diğer antibiyotikler için EUCAST Version 8.0 (Ocak 2018) [55]'in kabul ettiği MİK değerlerine göre okunmuştur.

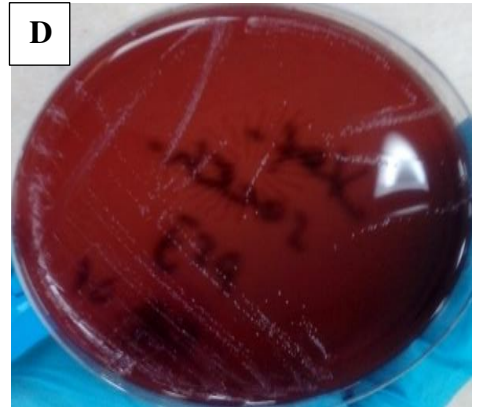
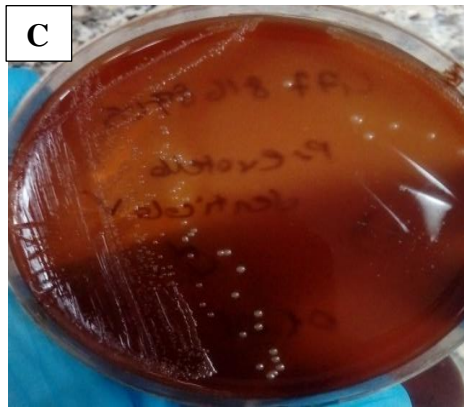
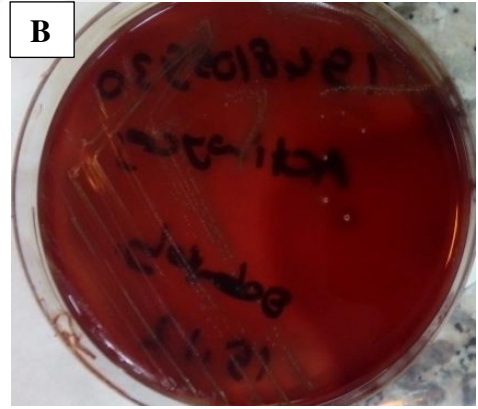
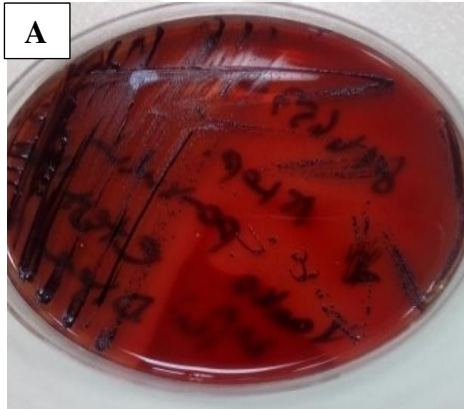
Resim 12: Ana plaktan E-test ve identifikasyon diskleri ile tanımlama için saflaştırma pasajı yapılmış anaeroplardır:

A: *Prevotella nigrescens*

B: *Actinomyces odontolyticus*

C: *Bacteroides theatomicron*

D: *Staphylococcus saccharolyticus* (Çalışmamızdan)



4.5.1 Antimikrobiyal duyarlılık testi

Anaerop bakterilerin antimikrobiklere duyarlılıklarının belirlenmesi için antimikrobik maddelerin MİK değerini veren E test stripleri kullanıldı. Duyarlılık deneyleri için kullanılan E test striplerinin MİK aralıkları ve kodları aşağıda verilmiştir.

Tablo 14: Çalışmamızda kullanılan E test striplerinin MİK aralıkları, kodları ve üretici firma

ANTİBİYOTİK DİSKİ	KODU	MİK ARALIĞI (MG/ML)	ÜRETİCİ FİRMA
İmipenem	IMI	0.002-32	Liofilchem, Italy
Benzilpenisilin	P	0.002-32	Liofilchem, Italy
Metronidazol	MTZ	0.016-256	Liofilchem, Italy
Sefoksitin	FOX	0.016-256	Liofilchem, Italy
Kloramfenikol	C	0.016-256	Liofilchem, Italy

Duyarlılık testi için besiyeri olarak Brucella agar besiyeri kullanıldı. Besiyeri için 9 cm çaplı petri kutuları kullanıldı. E test stripleri -20 °C’de saklandı ve kullanılmadan 30 dakika önce oda ısısına çıkartıldı. Her petri kutusuna 1 adet E test sribi yerleştirildi. Standart suş olarak *Bacteroides fragilis* (ATCC 25285) kullanıldı. (ATCC = American Type Culture Collection)

4.5.1.1. E testinin yapılışı:

Saf ve 24-48 saatlik genç kültürlerden alınan kolonilerin, Mc Farland 1.5 bulanıklığına uyacak şekilde buyyonda bakteri süspansiyonları hazırlandı. Süspansiyonu hazırlanan buyyondan steril eküvyon kullanılarak alınan örnek, Brucella agar besiyerine tüm yüzeyi kaplayacak şekilde sürüldükten sonra E test stripleri, steril penset yardımı ile, her bir petri kabına farklı antimikrobik içeren bir

adet E test stribi besiyeri yüzeyinde hava kabarcığı kalmayacak şekilde yerleştirildi. Anaerop koşullarda, anaerop poşet, jar yada anerop konteynır içinde 37 °C’de 48 saat inkübe edildi. Bu sürenin sonunda agar yüzeyinde E test striplerinin çevresinde elipsoid görünümde inhibisyon zonlarının oluşumu gözlemlendi. İnhibisyon zonu ve E test striplerinin kesiştiği noktadaki değer, MİK olarak kabul edildi. MİK değerine göre Duyarlı (S) ve dirençli (R) olarak iki gruba ayrıldı.

Resim 13: Bazı anaerop bakterilerin antibiyotik duyarlılıkları

A : *Anaerococcus vaginalis*

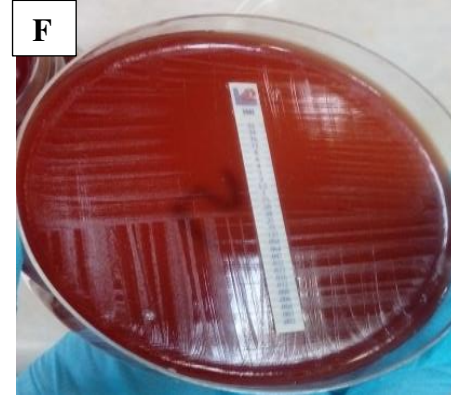
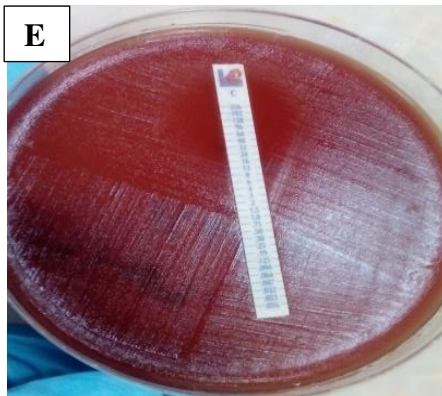
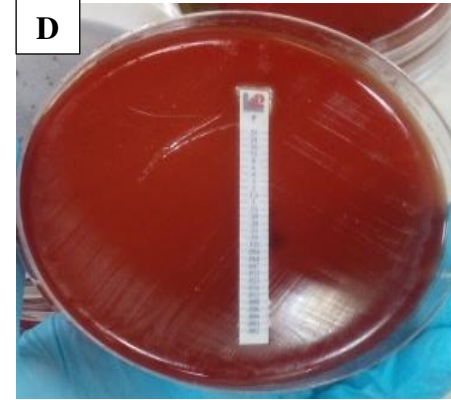
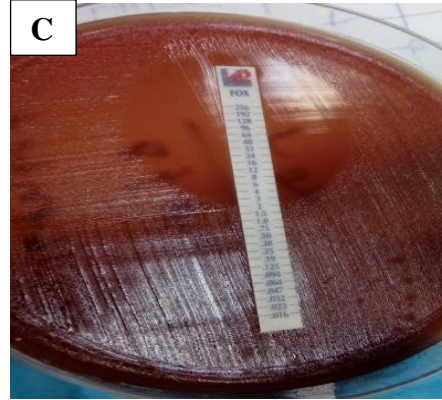
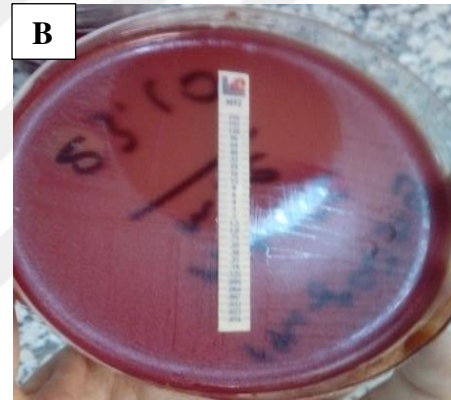
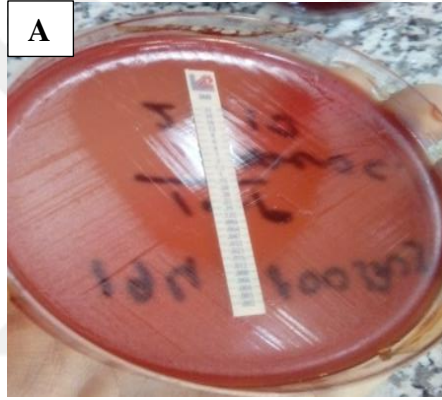
B : *Anaerococcus vaginalis*

C: *B.fragilis*

D: *P.acnes*

E: *Finogoldia magna*

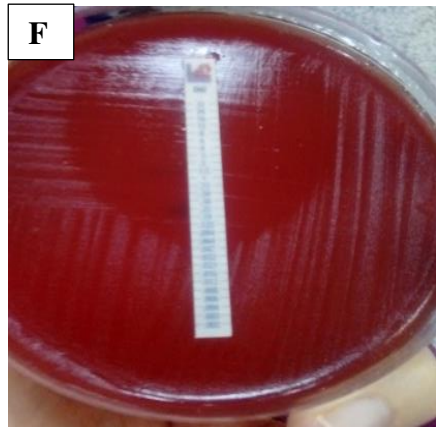
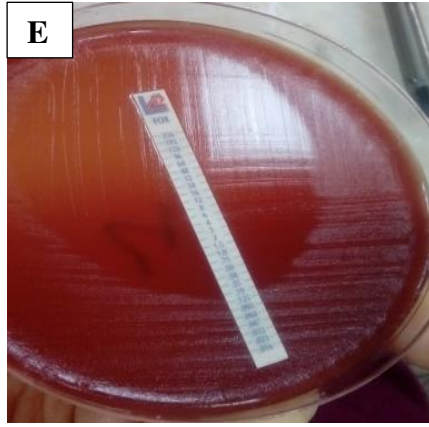
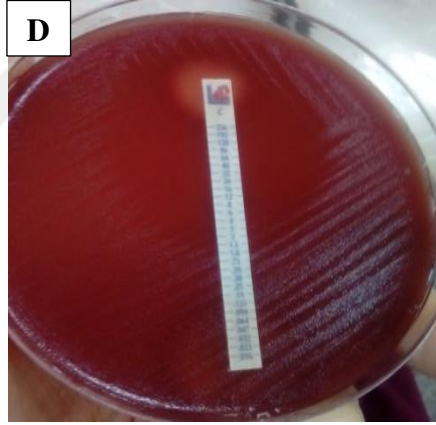
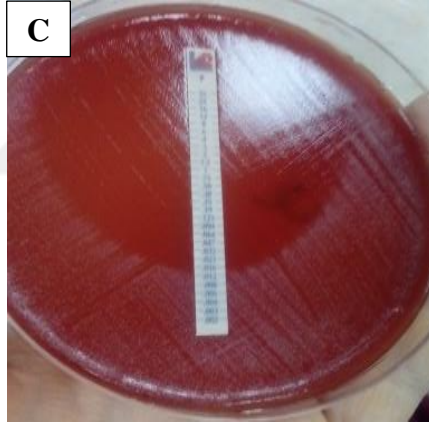
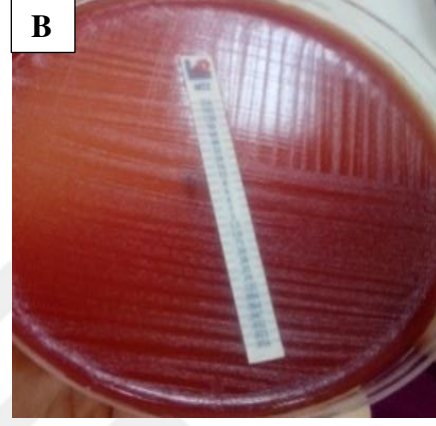
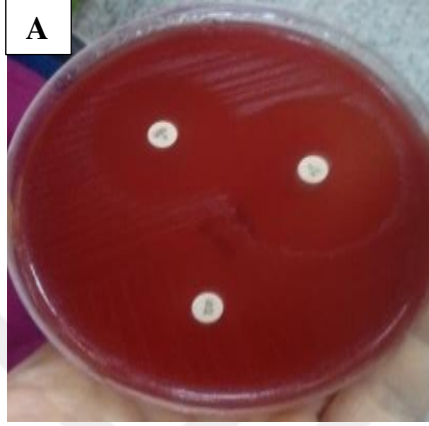
F: *Peptostreptococcus* spp.



Resim 14. *A.radingae*'nin E test yöntemiyle antibiyotik duyarlılığı ve identifikasyon diskleri ile tanımlanması (Çalışmamızdan).

A: Vankomisin, kanamisin duyarlı, kolistin dirençli
B: Metronidazol dirençli
C: Penisilin duyarlı

D: Kloramfenikol duyarlı
E: Sefoksitin duyarlı
F: İmipenem duyarlı



Tablo 15: Üretici firmanın önerdiği (EUCAST veya CLSI'a göre) duyarlılık ve direnç değerleri

EUCAST	S($\leq$)	R(>)
Benzilpenisilin	0.25	0.5
İmipenem	2	8
Kloramfenikol	8	8
Metronidazol	4	4

CLSI	S($\leq$)	I	R($\geq$)
Sefoksitin*	16	32	64

*Sefoksitin için MIK değeri EUCAST'te bulunmadığından CLSI MIK değerine göre değerlendirme yapıldı.

4.6.İzolatların Saklanması

Tüm anaerob izolatlar yağı alınmış süt tozu (skim milk) ile hazırlanmış vida kapaklı suş saklama tüpleri, gliserollü triptik soy Broth içeren boncuklu tüpler olmak üzere 2 ayrı ortamda -20°C'de saklandı.

5. BULGULAR

Çesitli klinik örneklerden izole edilen anaerop suşlar tanımlandıktan sonra antibiyotik duyarlılık testleri yapıldı.

Klinik örneklerin 224 (%62,7)'ü apse, 15 (%4,2)'i asit mayı, 9 (%2,5)'u safra sıvısı, 25 (%7)'i plevra, 36 (%10)'sı eklem, 48 (%13,4)'i doku örneği idi. Toplam 359 örneğin 2 tanesi red kriterlerine göre (eküvyonla geldiği için) kabul edilmedi.

Anaerop kültür yapılan 357 örnekten üreme saptananların 45'inde (%12,6) sadece anaerop, 89'unda (%24,9) sadece aerop/ fakültatif anaerop, 19'unda (%5,3) hem aerop hem de anaerop üreme saptandı. Örneklerin 204 (%57,1)'ünde üreme olmadı.

Üreme saptanan örneklerden toplam 219 mikroorganizma izole edilmiş olup bunların 95'i anaerop bakteri, 122'si aerop/ fakültatif anaerop bakteri ve 2'si Candida türü idi. 224 apse örneğinden 20'sinde anaerop, 8'inde aerop ve anaerop bakteri soyutlandı.

Anaerop istemle gelen ve işleme alınan kültürlerin 64'ünde (%17,9) anaerop üreme oldu. Anaerop üreme saptanan 64 örnekten 95 adet anaerop bakteri soyutlandı. Her bir anaerop üreme başına 1.4 adet anaerop bakteri üremesi oldu.

Tablo 16: Anaerop kültür istemi ile gelen örnek türleri ve üreme oranları

ÖRNEK TÜRÜ	SAYI (%)	SADECE ANAEROP ÜREME OLAN KÜLTÜR SAYISI	SADECE AEROP ÜREME OLAN KÜLTÜR SAYISI	AEROP VE ANAEROP ÜREYEN KÜLTÜR SAYISI	ÜREYEN ANAEROP M.O. SAYISI	ÜREYEN AEROP M.O. SAYISI	ÜREME OLMAYAN KÜLTÜR SAYISI
ABSE	224 (62.7)	20	83	8	47	106	113
ASİT MAYI	15 (4.2)	0	0	2	3	0	13
SAFRA	9 (2.5)	0	2	0	0	3	7
PLEVRA	25 (7.0)	3	2	4	11	2	16
EKLEM	36 (10.0)	7	1	2	12	5	26
DOKU	48 (13.4)	15	1	3	22	7	29
TOPLAM SAYI VE (%)	357 (100)	45 (12.6)	89 (24.9)	19 (5.3)	95	123	204

Anaerop enfeksiyon ön tanısı ile gönderilen örneklerden 20 ‘si gram negatif, 99’u gram pozitif ve 2’si maya olmak üzere toplam 123 adet aerop mikroorganizma üredi. Gram negatif bakterilerden en sık *E.coli* ve gram pozitiflerden en sık viridans grubu streptokoklar izole edildi. (Tablo 17)

Tablo 17. Kinik örneklerde aerop üreyen mikroorganizmaların dağılımı

ÖRNEK TÜRÜ	GRAM NEGATİF BAKTERİLER – SAYI				GRAM POZİTİF BAKTERİLER - SAYI					Maya	TOPLAM
	<i>E.coli</i>	<i>Klebsiella spp</i>	<i>Enterobacter, Citrobacter ve Proteus spp.</i>	<i>P.aeruginosa</i>	<i>Viridans Grubu</i>	<i>Strep. pyogenes</i>	<i>Staph. aureus</i>	<i>Enterococcus spp.</i>	KNS ve Difteroid Basil	<i>C.parapsilosis</i> <i>C.glabrata</i>	
APSE	8	5	1		37	4	27	8	14	2	106
ASİT MAYİ											
SAFRA	1	1		1							3
PLEVRA	1				1						2
EKLEM	1				2				2		5
DOKU	2		1		3				1		7
TOPLAM	13	6	2	1	43	4	27	8	17	2	123

Toplamda tanımlanan 95 anaerop bakteriden yapılan saflaştırma pasajları ve E-test çalışmalarında 36 ‘sında üreme olmamıştır. Kalan 59 anaerop bakteriye E-test yöntemi ile antibiyotik duyarlılık testi yapıldı. Bunların 16 (%27,2)’sı gram negatif ve 43 (%72,8)’ü gram pozitif. (Tablo 18).

Tablo 18: E-test yapılan 59 anaerop bakterinin sayı ve isimleri:

GRAM NEGATİF ANAEROPLAR (16) (%27.2)	GRAM POZİTİF ANAEROPLAR (43) (%72.8)	
• <i>B.fragilis</i>(4) • <i>B.theatomicron</i> • <i>Porphyromonas</i> spp. • <i>Porphyromonas somerae</i> • <i>F.nechrophorum</i>(2) • <i>Prevotella</i> spp. • <i>P. nigrescens</i> • <i>P. denticola</i> • <i>Mobilincus</i> spp. • <i>D.pneumosintes</i> • <i>C. sputigena</i> • <i>V.parvula</i>	<i>Propionobacterium</i> • <i>P.avidum</i> (2) • <i>P.acnes</i> (8) <i>Lactobacillus</i> • <i>L.rhamnosus</i>(2) • <i>L.paracasei</i> <i>Anaerococcus</i> • <i>A.lactolyticus</i> • <i>A.vaginalis</i> • <i>Anaerococcus</i> spp.(3) <i>Actinomyces</i> • <i>A.europeaus</i> • <i>A.oris</i> (2) • <i>A.radingae</i> (3) • <i>A.odontolyticus</i> • <i>A.schaalii</i>	<i>Peptoniphilus/peptostrep.</i> • <i>P.harei</i> (2) • <i>P.anaerobius</i> • <i>Peptoniphilus</i> spp. • <i>P.gorbachii</i> <i>F.magna</i> (3) <i>S.gordonii</i> <i>P.micra</i> <i>S.saccharolyticus</i> G(+)Basil <i>B.extructa</i> <i>A.rimae</i> <i>E.cateniformis</i> <i>E.lenta</i> <i>G.haemolysans</i>

Toplamda 59 anaerop bakterinin E-test yöntemiyle antimikrobiyal duyarlılık testi yapılmıştır. Anaerop gram negatif 16 bakteriye ve anaerop gram pozitif 43 bakteriye antibiyotik duyarlılık testi yapıldı: Anaerop gram negatif bakterilerin antibiyotik duyarlılık test sonuçları: (Tablo 19)

- *Bacteroides fragilis* suşlarında, metronidazol, sefoksitin ve imipenem için direnç oranları 1/4, kloramfenikol için 3/4, benzilpenisilin için 4/4 olarak saptandı.
- Bir *Bacteroides theatomicron* suşu benzilpenisiline dirençli bulunurken; imipenem, sefoksitin, metronidazol ve kloramfenikole duyarlı bulundu.
- Bir *Porphyromonas somerae* suşu tüm antibiyotiklere duyarlı bulundu. MALDI-TOF MS ile tanımlanamayan identifikasyon diskleri ile *Porphyromonas* spp. olarak tanımlanan bir suş da tüm antibiyotiklere dirençli bulundu.
- *Prevotella* spp. suşlarında kloramfenikole 2/3 ve benzilpenisiline 2/3 direnç saptandı.
- Üç *Prevotella* suşu da imipenem, metronidazol ve sefoksitine duyarlı bulundu.

- İki *Fusobacterium nechrophorum* suşunda metronidazol'e 1/2 direnç saptandı.
- İki suş da imipenem, sefoksitin, kloramfenikol ve benzilpenisiline duyarlı bulundu.
- Bir *Veilonella* spp. kloramfenikol ve penisiline dirençli bulunurken, imipenem, sefoksitin ve benzilpenisiline duyarlı bulundu.
- Bir *Capnocytophaga sputigena* imipenem ve sefoksitine duyarlı bulunurken, metronidazol, kloramfenikol ve benzilpenisiline dirençli bulundu.
- Bir *Mobilincus* spp. sefoksitine duyarlı bulunurken, imipenem, metronidazol, kloramfenikol ve benzilpenisiline dirençli bulundu.
- Bir *Dialister pneumosintes* metronidazol ve benzilpenisiline dirençli bulunurken, imipenem, sefoksitin ve kloramfenikole duyarlı bulunmuştur. (Tablo 19)

Anaerob gram pozitif bakterilerin antibiyotik duyarlılık test sonuçları: (Tablo 19)

- İki *Propionobacterium avidum* için metronidazol direnci 2/2, kloramfenikol direnci 1/2 bulundu. 2 suş da diğer antibiyotiklere duyarlı bulundu.
- Sekiz *Propionobacterium acnes* için metronidazol direnci 8/8, imipenem direnci 1/8, kloramfenikol direnci 1/8, benzilpenisilin direnci 1/8 bulundu. Sefoksitin direnci tespit edilmedi.
- Bir anaerob gram pozitif basil MALDI-TOF MS ile tanımlanamadı. İdentifikasyon diskleri ile tanımlamada vankomisin ve kanamisin duyarlı, kolistin dirençli bulundu. E-test sonucu ise imipenem duyarlı, diğer antibiyotikler dirençli olarak bulundu.
- Üç *Lactobacillus* spp. suşu için metronidazol direnci 3/3, imipenem direnci 2/3, sefoksitin direnci 2/3, kloramfenikol direnci 1/3, benzilpenisilin direnci 1/3 bulundu.
- Bir *Eggerthiella cateniformis* suşu metronidazol ve benzilpenisiline dirençli, imipenem, kloramfenikol ve sefoksitine duyarlı bulundu.
- Bir *Eggerthella lenta* suşu imipenem ve sefoksitine duyarlı, diğer antibiyotiklere dirençli bulunmuştur.
- Beş *Anaerococcus* suşu için imipenem direnci 1/5, metronidazol direnci 4/5, benzilpenisilin direnci 2/5 bulundu. Suşların hiçbirinde kloramfenikol ve sefoksitin direnci tespit edilmedi.
- Sekiz *Actinomyces* suşu için imipenem direnci 1/8, metronidazol direnci 8/8 (intrinsek direnç) bulundu. Sefoksitin, kloramfenikol ve benzilpenisilin direnci tespit edilmedi.
- Diğer anaerob gram pozitif koklar için imipenem direnci 3/12, metronidazol direnci 8/12, sefoksitin direnci 2/12, kloramfenikol direnci 3/12, benzilpenisilin direnci 7/12 bulundu.
- Diğer iki anaerob gram pozitif basil için metronidazol direnci 1/2, kloramfenikol direnci 1/2, benzilpenisilin direnci 2/2 bulundu. 1 suş sefoksitine orta duyarlı diğeri duyarlı bulundu. İmipeneme direnç tespit edilmedi. (Tablo 19).

Tablo 19: 59 Anaerop bakterinin antibiyotik direnç sayı ve oranları

Bakteri Adı	Üreyen bakteri sayısı n(%)	IMI n(%)	MTR n(%)	FOX n(%)	C n(%)	PG n(%)
Gram Negatifler	16 (27.2)					
<i>B.fragilis</i>	4 (6.7)	1 (25)	1 (25)	1 (25)	3 (75)	4 (100)
<i>B.theatomicron</i>	1 (1.69)	0	0	0	0	0
<i>Porphyromonas spp.</i>	2 (3.38)	1 (50)	1 (50)	1 (50)	1 (50)	1 (50)
<i>F.necrophorum</i>	2 (3.38)	0	1 (50)	0	0	0
<i>Prevotella spp.</i>	3 (5.0)	0	0	0	2 (66.6)	2 (66.6)
<i>Mobilincus spp.</i>	1 (1.69)	1 (100)	1 (100)	0	1 (100)	1 (100)
<i>D.pneumosintes</i>	1 (1.69)	0	1 (100)	0	0	1 (100)
<i>C. sputigena</i>	1 (1.69)	0	1 (100)	0	1 (100)	1 (100)
<i>V.parvula</i>	1 (1.69)	0	0	0	1 (100)	1 (100)
Gram pozitifler	43 (72.8)					
<i>Propionobacterium spp.</i>	10 (16.9)	1 (10)	10 (100)	0	2 (20)	1 (10)
G(+)Basil	1 (1.69)	0	1 (100)	1 (100)	1 (100)	1 (100)
<i>B.extructa</i>	1 (1.69)	0	0	1	0	1 (100)
<i>A.rimae</i>	1 (1.69)	0	1 (100)	0	1 (100)	1 (100)
<i>Lactobacillus spp.</i>	3 (5.0)	2 (66.6)	3 (100)	2 (66.6)	1 (33.3)	1 (33.3)
<i>Eggerthia spp.</i>	2 (3.38)	0	2 (100)	0	1 (50)	2 (100)
<i>Anaerococcus spp.</i>	5 (8.4)	1 (20)	4 (80)	0	0	2 (40)
<i>Actinomyces spp.</i>	8 (13.5)	1 (12.5)	8 (100)	0	0	0
<i>G.haemolysans</i>	1 (1.69)	0	1 (100)	0	0	0
<i>Peptoniphilus/peptostrep.</i>	5 (8.4)	2 (40)	3 (60)	2 (40)	1 (20)	4 (80)
<i>F.magna</i>	3 (5.0)	1 (33.3)	2 (66.6)	0	2 (66.6)	2 (66.6)
<i>S.gordonii</i>	1 (1.69)	0	1 (100)	0	0	1 (100)
<i>P.micra</i>	1 (1.69)	0	0	0	0	0
<i>S.saccharolyticus</i>	1 (1.69)	0	1 (100)	0	0	0
TOPLAM	59	11 (18.6)	42 (71.1)	7 (11.8)	18 (30.5)	27 (45.7)

n: Bakteri Sayısı

IMI : İmipenem

C : Kloramfenikol

MTR : Metronidazol

PG : Benzilpenisilin

FOX

: Sefoksitin

6. TARTIŞMA

İnsan ve hayvan patojenleri arasında önemli bir yere sahip olan anaerop mikroorganizmalar ciddi hatta mortal enfeksiyonlara neden olabilir. İzole edilmeleri zahmetli ve uzun zaman alıcı olsa da anaerop mikroorganizmalar için kültür halen altın standarttır. İzole edildikten sonra identifikasyonları ve antibiyotik duyarlılıklarının belirlenmesinde de zorluklar bulunmaktadır. Örnek seçimi, alımı, nakledilmesi, besiyeri seçimi ve inkübasyon şartları gibi tüm faktör ve aşamaların en ideal düzeyde tutulması anaerop bakterilerin izolasyonu için önemlidir.[56]

Dünya çapında bazı antibiyotik sınıflarına direnç artmaktadır. Direnç oranları coğrafi bölge ve bakteri türlerine göre değişiklik göstermektedir. Uygun antibiyotik tedavisini yönlendirmesi açısından antimikrobiyal duyarlılık testleri önemlidir. Anaerop bakteri enfeksiyonları ağır ve hayatı tehdit edici olabilir. Anaeroplara için antimikrobiyal duyarlılık testleri sıklıkla laboratuvarlarda çalışılmamaktadır, fakat uygun tedaviyi yönlendirmesi açısından bu testler önemlidir.[57]

Wybo ve ark.[11] 403 anaerop izolatın %15'inin apse örneklerinden soyutlandığını saptamıştır.

Jeverica ve ark.[58] Slovenya'da 2017 yılında yapılan bir çalışmada 2673 anaerop izole etmiştir. Bunların %57'si cilt ve yumuşak doku enfeksiyonları, %21'i abdominal enfeksiyonlar, %5'i baş –boyun enfeksiyonları, %5'i kan kültürlerinden üretilmiştir. En yüksek anaerop üremeyi (%57) cilt ve yumuşak doku enfeksiyonlarından elde etmişlerdir.

Demir C.[59], 2015 yılındaki tez çalışmasında, anaerop bakterilerin identifikasyonunda konvansiyonel yöntemlerle beraber Vitek 2 (BioMerieux, Fransa) otomatize sistemi, antibiyotik duyarlılık testi için de E-test yöntemi kullanmıştır. Bu çalışmada en yüksek gram negatif anaerop basil üreme oranları, apse (%46.4), periton mayi (%17.8) ve doku örneği (% 14.2) olarak saptanmıştır.

Uysal ve ark.[60] anaerop bakterilerin identifikasyonunda yarı otomatize sistem olan BBL Crystal System (Becton Dickinson, USA) yöntemi kullanmıştır.

İzole ettikleri anaeroplardan en çok apse (%44.8), sonra sırası ile yara (%22.4) ve yumuşak doku-kemik (%11.2) örneklerinden elde edildiğini saptamışlardır.

Doğan ve ark.[61] anaerop bakterilerin tanımlanması için identifikasyon diskleri ile API 20A (Anaerobe Phenotypic Identification, BioMerieux, France) yarı otomatize sistemi, antibiyotik duyarlılık testi için de E-test yöntemi kullanmıştır. Bu çalışmada izole edilen anaerop bakterilerin en sık apse (%57.1) örneklerinden elde edildiği saptanmıştır.

Türkkan A.A. [56], 2008 yılındaki tez çalışmasında anaerop bakterilerin tanımlanması için identifikasyon diskleri ve API 20A (Anaerobe Phenotypic Identification, BioMerieux, France) yarı otomatize sistemi, antibiyotik duyarlılık testi için de E-test yöntemi kullanmıştır. Üreyen anaeroplardan çoğunluğu apse (%53.7) örneklerinden elde edilmiştir.

Kaya S. [62], 2012 yılındaki tez çalışmasında anaerop bakterilerin identifikasyonunda API 20A (Anaerobe Phenotypic Identification, BioMerieux, France) yarı otomatize sistemi, antibiyotik duyarlılık testi için de Agar dilüsyon yöntemini kullanmıştır. İzole edilen anaerop bakterilerin daha çok apse (%21.6) örneklerinden izole edildiğini bulmuştur.

Bizim çalışmamızda da, identifikasyon için antibiyotik emdirilmiş diskler ve MALDI- TOF MS (BioMerieux, France) sistemi, antibiyogram için de E-test metodu kullanılmıştır. Üreyen anaerop bakterilerin çoğunluğu (%49.4) abse örneklerinden elde edilmiştir. Bu oranın ülkemizde ve yurtdışında yapılmış diğer çalışmalarla uyumlu olduğunu söyleyebiliriz.

Ercis ve ark. [63] tanımlama için identifikasyon diskleri ve “BBL Crystal System” (Becton Dickinson, USA) kullanmıştır. Anaerop kültür yapılan 367 örneğin %32.7’sinde üreme olmadığını,%39.2’sinde sadece aerop, %7.6’sında sadece anaerop, %20.5’inde aerop ve anaerop birlikte üremesi saptamışlardır.

Koru ve ark.[9] antimikrobiyal duyarlılık testlerinden E-test, ATB-ANA ve Agar dilüsyon metodlarını kullanmış ve karşılaştırmışlardır. 322 örnekten 60 anaerop bakteri izole etmişlerdir.

Uysal ve ark.[60] anaerop enfeksiyon ön tanısı ile gelen 543 örneğin kayıtlarını geriye dönük olarak incelemiştir. Çalışılan örneklerin 409'unda (%75,3) üreme görülmediği, 134 örnekte (%24,6) çeşitli anaerop bakterilerin ürediği saptanmıştır.

Taner Z.[64], 2015 yılındaki tez çalışmasında, 100 mastitli hastanın inceledikleri cerahat örneklerinin %38'inde üreme olmadığını, %47'sinde sadece aerop, %8'inde sadece anaerop, %9'unda aerop ve anaerop birlikte üremesi saptamıştır.

Kaya S.[62], 2012 yılındaki tez çalışmasında, 296 klinik örnekten 15' inde sadece anaerop (%5.0), 11 (%3.7)'sinde ise anaerop ve fakültatif anaeroplara beraber ürediğini saptamıştır.

Demir C.[59], 2015 yılındaki tez çalışmasında, 278 örneğin 143 (%51.4)'ünde üreme olmadığını, 107 (%38.5)'sinde sadece fakültatif anaerop, 28 (%10)'inde sadece anaerop ve 13 (%4.7)'ünde fakültatif anaerop ve anaeroplara birlikte ürediğini saptamıştır.

Türkkan A.A.[56], 2008 yılındaki tez çalışmasında 241 örneğin 136 (%56.4)'sında üreme olmadığını, 74 (%30.7)'ünde sadece aerop, 31 (%12.9)'inde sadece anaerop, 17(%7)'sinde aerop ve anaeroplara beraber ürediğini saptamıştır.

Doğan ve ark.[61] 100 klinik örnekten 63 (%63)'ünde üreme olmadığını, 14 (%14)'ünde sadece anaerop, 8 (%8)'inde ise anaerop ve fakültatif anaeroplara beraber ürediğini 15 (%15)'inde de sadece aerop üreme olduğunu saptamıştır.

Çalışmamızda 357 örneğin 45'inde (%12.6) sadece anaerop, 89'unda (%24.9) sadece aerop/ fakültatif anaerop, 19'unda (%5.3) hem aerop hem de anaerop üreme saptandı. Örneklerin 204 (%57.1)'sinde üreme olmamıştır. (Tablo 15). Anaerop istemle gelen ve işleme alınan kültürlerin 64'ünde (%17.9) anaerop üreme oldu. Buna göre bizim çalışmamızdan elde edilen bu oranlar ülkemizdeki çalışmalara benzer bulunmuştur.

Türkkan A.A. [56], 2008 yılındaki tez çalışmasında, anaerop üreme olan 31 örnekten 54 adet anaerop bakteri izole edilmiştir. Anaerop üreme başına 1.7 anaerop bakteri saptanmıştır. Bizim çalışmamızda ise anaerop üreme saptanan 64 örnekten 95 adet anaerop bakteri soyutlandı. Her bir anaerop üreme başına 1.4 adet anaerop bakteri üremesi oldu. Bizim sonucumuzla bu çalışma sonucunun uyumlu olduğu saptanmıştır.

Kaya S.,[62] 2012 yılındaki tez çalışmasında, izole edilen anaeroplardan 14 (% 53.8)'ünü gram negatif anaerop basiller, 7 (%26.9)'sini gram pozitif anaerop basiller, 5(%19.2)'ini de gram pozitif anaerop kokların oluşturduğunu saptamıştır.

Türkkan A.A. [56], 2008 yılındaki tez çalışmasında, anaerop üreme olan 31 örnekte en çok *B.fragilis* grup(%45.1) (n:14), *Porhyromonas* spp. (%32.2) (n:10) ve *Peptostreptococcus* spp. (%32.2) (n:10) izole edilmiştir. Aerop üreme olan örneklerin %39.1'ini *Enterobacteicaee* üyeleri, %25.7'sini *Staphylococcus* türleri, 4'ünü *Candida*, 3'ünü küf türlerinin oluşturduğunu tespit etmiştir.

Doğan ve ark.[61] üreyen anaeroplardan 14 (% 53.8)'ünü gram negatif anaerop basiller, 7 (%26.9)'sini gram pozitif anaerop basiller, 5(%19.2)'ini de gram pozitif anaerop kokların, 1 tanesini de *Candida* spp. nin oluşturduğunu saptamıştır . 100 örnekten toplam 33 fakültatif anaerop izole edilmiş. Bunlardan 19 gram pozitif kok, 14 gram negatif basil üretilmiştir. Gram negatif bakterilerden en sık *E.coli* (4 izolat) ürediği tespit edilmiştir.

Jeverica ve ark. [58] izole edilen anaeroplardan %54'ünü gram negatif anaerop basiller, %22'sini gram pozitif anaerop koklar, %21'ini gram pozitif anaerop basillerin oluşturduğunu tespit etmişler. Gram negatif anaerop basillerden en sık *Bacteroides* spp. (%37), ikinci olarak *Prevotella* spp. (%14), 3.sıklıkta *Fusobacterium* spp. (%7) ürediği saptanmıştır. Gram pozitif anaerop koklardan en sık *Finogoldia* spp. (%8), 2.sıklıkta *Peptoniphilus* spp. (%6), 3.olarak da %5 oranda *Anaerococcus* spp. ürediği tespit edilmiştir. Gram pozitif anaerop basillerden en sık *Propionobacterium* spp. (%8), 2.sıklıkta *Clostridium* spp. (%7), 3.sıklıkta ise %4 oranla *Actinomyces* spp. ürediği tespit edilmiştir.

Uysal ve ark.[60] çalışmasında izole edilen anaerop bakteriler arasında da en fazla üreyen bakterinin *Bacteroides* spp. (%29,9) olduğu görülürken, ikinci sırada *Peptostreptococcus* spp. (%23,1), üçüncü sırada *Propionibacterium* spp. (%20,2) olduğu bulunmuştur.

Taner Z. [64]'nin, 2015 yılındaki tez çalışmasında, 100 hastanın cerahat örneklerinden aerop en çok üreyen etkenler gram pozitif koklar (en sık *S.aureus*, 2.sıklıkta *S.epidermidis*), 2.sıklıkta *Corynebacterium*'lar, 3.sıklıkta gram negatif çomaklar bulunmuştur. Gram negatif çomaklardan en fazla *E.coli* ürediği tespit edilmiştir. Anaeroplardan en sık *Peptostreptococcus* spp. (%17.8), ikinci sırada *Propionibacterium* spp. (%6.8), üçüncü sırada *Bacteroides fragilis* (%4.3) ürediği tespit edilmiştir.

Coltella ve ark.[65] pediatrik hastalardaki 318 örnekten yaptığı çalışmalarında anaerop üremelerden en sık(%76.8) *Clostridium* spp.'lerin izole edildiğini saptamışlardır.

Erciş ve ark.[63] anaerop enfeksiyon ön tanısı ile gelen örneklerde en fazla *Bacteroides* türleri(%23), 2.sırada gram pozitif anaerop koklar(%20.3), 3.sırada *Clostridium* türlerinin(%7.8) izole edildiğini saptamışlardır.

Başka bir çalışmada ise, gangrenöz ve perfore apandisit olgularından izole edilen anaerop bakterilere, en sık olarak *E. coli*'nin eşlik ettiğini belirtilmiştir [66]. Saini ve ark. [67] pelvik inflamatuvar hastalığı olan hastaların, cul-de-sac aspirat mayilerinde enfeksiyonun %43 oranında polimikrobiyal etkenli olduğunu ve anaerop bakterilere en sık olarak sırasıyla, *Escherichia coli*, koagülaz negatif stafilokoklar, *Staphylococcus aureus* ve *Klebsiella pneumoniae*'nin eşlik ettiğini bildirmişlerdir. Kanseri hastalarının kan kültürü örneklerinde enfeksiyon etkenlerinin araştırıldığı bir çalışmada [68], anaerop bakteri enfeksiyonlarına en sık *Escherichia coli*'nin eşlik ettiğinden bahsedilmiştir.

Demir C. [59], 2015 yılındaki tez çalışmasında, anaerop üreme olan örneklerde en çok *B.fragilis* grup(%50), ikinci sıklıkta *Prevotella* spp.(%32.1), üçüncü sıklıkta *Fusobacterium* spp. (%17.9) izole edildi.

Wybo ve ark. [11] çalışmalarında anaerop izolatlardan en sık *Bacteroides* ve *Parabacteroides* spp. (%45) izole edildiğini, *Prevotella* spp. ve diğer Gram negatif basiller % 13, anaerop koklar % 13, *Fusobacterium* spp. % 5, sporsuz anaerop gram pozitif basiller % 10, *Clostridium* spp. % 9 oranda ürediğini saptamışlardır.

Bizim çalışmamızda üreme saptanan örneklerden toplam 219 mikroorganizma izole edilmiş olup bunların 95'i anaerop bakteri, 122'si aerop/fakültatif anaerop bakteri ve 2'si *Candida* türü idi. 124 aerop mikroorganizmadan en sık Viridans grubu streptokoklar(43), ikinci sıklıkta *S.aureus*(27), gram negatiflerden de en sık *E.coli* (12) izole edilmiştir. (Tablo 16).

Bahsedilen çalışmalardan aerop verisi olanlardan genel bir sonuç çıkarılamamakla beraber bizim çalışmamız karşılaştırıldığında, gram pozitif koklardan *S.aureus*'un ve gram negatif basillerden *E.coli*'nin en sık üreyen etkenler olduğu bulunmuştur. Bizim çalışmamızda olduğu gibi candida sayısı oldukça düşük bulunmuştur. Bizde de gram negatiflerden en sık *E.coli* üremiştir. Gram pozitif koklardan ise viridans grubu streptokoklar ilk sırada ürerken, *S.aureus* ikinci sıklıkta üremiştir. Bunun nedeni bizim çalışmamızın sadece anaerop kültürlerin değerlendirilmesinden kaynaklandığını düşünmekteyiz.

Bizim çalışmamızda anaerop izolatların %72.8'ini gram pozitif anaeroplara, %27.2' ini gram negatif anaeroplara oluşturmaktaydı. Gram pozitif anaeroplardan en sık *Propionobacterium* spp. (10), ikinci sıklıkta *Actinomyces* spp. (8) soyutlanmıştır. Gram pozitif anaerop koklardan ise en sık *Peptostreptococcus* spp. (5) ve *Anaerococcus* spp. (5) izole edilmiştir. Gram negatif anaeroplardan ise en fazla *B.fragilis* grup (5) ve *Prevotella* spp. (4) izole edilmiştir.

Yukarıda bahsedilen çalışmaların sekizinde ise anaerop üremelerden 1.sırayı gram negatif anaerop basiller, çalışmalardan birinde gram pozitif basiller, diğer çalışmada da gram pozitif kokların aldığı saptanmıştır. Genellikle gram pozitif anaerop basiller 2.sıklıkta, gram pozitif anaerop koklar 3.sıklıkta üremiştir Bu çalışmalarla karşılaştırıldığında bizim çalışmamızda anaerop gram negatif bakterilerin çok daha düşük oranda çıktığı bulunmuştur. Benzer şekilde Gram negatif bakterilerden en sık *B.fragilis*, gram pozitif anaerop koklardan en sık

Peptostreptococcus spp., gram pozitif anaerob basillerden de en sık *Propionobacterium* spp. izole edilmiştir.

Anaerob antimikrobiyal duyarlılık test yöntemlerinden agar dilüsyon metodu referans yöntem olarak kabul edilmektedir. Ancak bu yöntem zahmetlidir ve rutin kullanım için pratik değildir. Aerob bakterilerde sıklıkla kullanılan ve bir referans yöntem olarak kabul edilen sıvı mikrodilüsyon yöntemi ise yalnızca *B. fragilis* grup için onay almıştır. Bizim çalışmamızda kullandığımız yöntem olan ve Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) onayı almış E test ise diğer yöntemlere göre nispeten pahalı olmakla birlikte, özellikle izolat sayısı az olduğunda test edilmesinde önerilen, pratik ve güvenilir bir yöntemdir [59].

Jeverica ve ark. [58] *B. fragilis* grubunun % 99'u penisiline, %8'i amoksisilin klavulunata, %1'i imipeneme, %27'si klindamisine dirençli bulunmuştur. *B. theatomicon* en dirençli (%42), *B. fragilis* en duyarlı izolat olarak bulunmuştur. *B. fragilis* izolatlarının, non *B. fragilis* izolatlarına göre amoksisilin klavulanat ve klindamisine daha dirençli, imipeneme daha duyarlı olduğu tespit edilmiştir. *B. fragilis* grup izolatlarından hiçbiri metronidazole dirençli bulunmamıştır.

Türkkan AA. [56], 2008 yılındaki tez çalışmasında, metronidazole direnç 12/51 (%23.5) bulunmuştur. *B. fragilis* grup izolatlarında metronidazol direnci %14.2 olarak bulunmuştur. Tikarsilin klavulanat ve piperasilin tazobaktama direnç saptamamışlardır. Klindamisine direnç en fazla *B. fragilis* grup izolatlarında (8/14) saptanmıştır.

Toprak N.U. ve ark. [69]'nın 100 *B. fragilis* izolatı ile yaptığı çalışmada, izolatların tamamı imipenem, amoksisilin klavulanat ve metronidazole duyarlı bulunmuştur.

Taner Z. [64] 'in, 2015 yılındaki tez çalışmasında, 2 *B. fragilis* izolatının ikisi de penisilin ve sefoksitine dirençli, imipenem, metronidazol, klindamisin ve amoksisilin klavulanata duyarlı bulunmuştur.

Demir C. [59], 2015 yılındaki tez çalışmasında, en yüksek direnç oranları penisilin (%78.5) ve sefoksitinde (%21.4) tespit edilmiştir. Klindamisine direnç en

fazla *B.fragilis* grup izolatlarında (%28.5) saptanmış. *B.fragilis* grup izolatlarından hiçbirinde metronidazol direnci görülmemiştir.

Syndman ve ark. [52] 6574 anaerop bakteri ile yaptıkları çalışmada karbapenemler ve piperasilin tazobaktama sırası ile direnç oranlarını %0.9 ve %2.3 olarak bulmuş ve en efektif ajanlar olarak saptamışlardır. Bu süreçte metronidazol dirençli *Bacteroides* suşu ilk kez izole edilmiştir.

Bizim çalışmamızda *Bacteroides fragilis* suşlarında, metronidazol, sefoksitin ve imipenem için direnç oranları 1/4, kloramfenikol için 3/4, benzilpenisilin için 4/4 olarak saptandı. Bir *Bacteroides theatomicron* suşu benzilpenisiline dirençli bulunurken, imipenem, sefoksitin, metronidazol ve kloramfenikole duyarlı bulundu. Jeverica ve ark. [58]' dan farklı olarak *B.theatomicron* en duyarlı izolat olarak bulunmuştur (tablo 18). *B.fragilis* grubunun hepsi penisiline dirençli bulunmuştur. Bu oranın çok yüksek olması diğer çalışmalarla uyumlu bulunmuştur. Ayrıca bu çalışmaların büyük kısmındaki gibi *B.fragilis* grubunun imipenem ve metronidazole duyarlı oluğu bulunmuştur.

Jeverica ve ark. [58] *Prevotella* spp.'lerde %60 oranda penisilin direnci tespit edilmiştir. Gram negatif anaerop basillerden *Fusobacterium* spp.'de direncin en az olduğu bulunmuştur. *Veillonella* türlerinde penisilin direnci %59 olarak tespit edilmiştir.

Bizim çalışmamızda *Prevotella* suşlarında kloramfenikole ve benzilpenisiline 2/3 direnç saptanmışken. Üç *Prevotella* suşu da imipenem, metronidazol ve sefoksitine duyarlı bulundu İki *Fusobacterium nechrophorum* suşlarında metronidazol'e 1/2 direnç saptandı. İki suş da imipenem, sefoksitin, kloramfenikol ve benzilpenisiline duyarlı bulundu. Bir *Veillonella* spp. suşu, kloramfenikol ve penisiline dirençli bulunurken, imipenem, sefoksitin ve metronidazole duyarlı bulundu. (Tablo 18)

Bahsedilen çalışmada Gram negatif anaeroplarda penisilin direncinin yüksek olması *Fusobacterium* spp.'de direncin çok az olması bizim çalışmamızla uyumlu bulunmuştur.

Taner Z. [64] 'in, 2015 yılındaki tez çalışmasında, 3 *Propionobacterium acnes* suşunun 3'ü de penisilin, imipenem, klindamisin, sefoksitin, metronidazol, amoksisilin klavulunata duyarlı bulunmuştur. 9 *Peptostreptococcus* türünün hepsi imipenem, klindamisin ve amoksisilin klavulunata duyarlı, 3'ü penisiline, 3'ü sefoksitine, 1'i metronidazole dirençli olarak saptanmıştır.

Jeverica ve ark. [58] Gram pozitif anaerob koklarda penisilin direncinin nadir (%2) olduğu, en sık *P.anaerobius* (%11) türlerinde görüldüğü saptanmıştır. Gram pozitif anaerob koklarda imipenem ve metronidazole direnç tespit edilmemiştir. *Propionobacterium* larda penisilin direnci %100 tespit edilmiştir. Bunların hepsi imipeneme duyarlı bulunmuştur. Metronidazolün anaeroplarda %100 etkili olduğunu bulmuşlardır.

Bizim çalışmamızda *Propionobacterium* spp. için benzilpenisilin direnci 1/10 olarak oldukça düşük oranda çıkmıştır. İmipenem direnci de 1/10 oranında olarak oldukça düşük bulunmuştur. Metronidazol direnci ise bu çalışmalardan farklı olarak %100 bulunmuştur.

Anaerob gram pozitif koklar için imipenem, sefoksitin ve kloramfenikol direnci düşüken, metronidazol ve benzilpenisilin direnci oldukça yüksek bulunmuştur. Bu çalışmalarla beraber değerlendirme yapıldığında anaerob gram pozitif koklar için en efektif ajanlardan biri imipenem olduğu söylenebilir.

Barberis ve ark.[70] 113 *Actinomyces* spp. ile yaptıkları çalışmada izolatların hepsinin penisilin, seftriakson, vankomisin ve linezolidde duyarlı bulmuşlardır. Bizim çalışmamızda da benzer şekilde 8 *Actinomyces* suşu için benzilpenisilin direnci tespit edilmemiştir.

Liderot ve ark. [71] kan örneklerinden elde ettikleri 18 *E. lenta* ile yaptıkları çalışmada benzilpenisilin ve piperasilin tazobaktama yüksek oranda direnç tespit etmişlerdir.

Bizim çalışmamızda da benzer şekilde 2 *Eggerrthella* spp.'nin ikisi de benzilpenisiline dirençli bulunmuştur.

Wyboo ve ark.[11] 403 anaerop izolatla yaptıkları çalışmada izolatların %98'ini kloramfenikole, % 92 'sini metronidazole, %40'ını penisiline, %79'unu sefoksitine, %96'sını meropeneme, %94'ünü amoksisilin klavulunata, %91'ini de piperasilin tazobaktama duyarlı bulmuşlardır.

Koru ve ark.[9]'nın 60 anaerop ile yaptıkları çalışmada imipenem en efektif (%100) ajan olarak tespit edilmiştir. Diğer antibiyotiklere duyarlılık oranları ise penisilin %36.7, amoksisilin klavulonat %83.3, metronidazol %85, sefoksitin %88.3 ve kloramfenikol %96.6 olarak saptanmıştır.

Diğer çalışma sonuçları ile beraber bizim çalışmamız değerlendirildiğinde anaeroplar için güvenilir antibiyotiğin oldukça değişken olduğu, direnç profillerinin türe göre, bölgesel vb. nedenlerle değişebildiği söylenebilir. Bizim çalışmamızın sonucuna göre gram negatif anaeroplar için sırası ile en efektif ajanlar sefoksitin, imipenem ve metronidazol iken, gram pozitif anaeroplar için en etkin ajanlar sırası ile sefoksitin, imipenem ve kloramfenikoldür. Buna göre anaerop mikroorganizmalar için sefoksitin ve imipenemin en etkili antimikrobiyaller olduğu söylenebilir.

Tanımlamada kullandığımız MALDI-TOF MS yönteminin dakikalar içinde sensitivitesi ve spesifitesi yüksek sonuç verebilmesi ve beraberinde identifikasyon diskleri ile kontrol, çalışmamızın güvenilirliğini arttırmıştır. Bununla beraber klinik örneklerden tanımlanan 95 adet anaerop bakterinin ancak 59 'una antibiyogram yapılabilmiş, diğerlerinin pasaj ve antibiyogram aşamasında üretilenmemiştir. Bu durum, özellikle oksijene hassasiyeti yüksek anaerop bakteriler için anaerop kabinde çalışmanın gerekliliği ve besiyerlerinin anaerop işlemlerden 12-24 saat önce anaerop ortamda bekletilmesinin faydalı olabileceğini düşündürmektedir. Anaerop kabinimizin olmaması ve besiyerlerini çalışma öncesi anaerop ortamda bekletmemek çalışmamızın kısıtlılıkları olabilir.

Sonuç olarak, anaerop bakteriler; ağır ve mortal olabilen enfeksiyonlara neden olması açısından oldukça önemli olmalarına rağmen, anaerop bakteriyoloji oldukça vakit alıcı ve zahmetlidir. Bu çalışmalar kısmen yüksek maliyetlidir, sabır ve deneyim gerektirir. Örneğin alınma şekli, zamanı, laboratuvara ulaştırılması süresi ve şekli gibi oldukça önemli olan sahip pre-analitık evre önemli ölçüde klinisyen ve

örneği transfer eden personele bağımlıdır. Bu nedenle en ideal sonuç için klinisyenle işbirliği ve iletişim çok önemlidir.

Klinik örnek laboratuvara ulaştıktan sonra analitik ve postanalitik evrenin de en ideal şartlarda yapılması gerekir. Bunun için besiyerlerinin kontaminasyondan uzak ve taze olması, optimum şartlarda saklanması, kültür, izolasyon, identifikasyon ve antibiyotik duyarlılık testlerinde standartlara uyulması ve dikkatli çalışılması özellikle anaerop bakteriyoloji için büyük önem taşımaktadır.

Anaerop bakteriler için rutinde antimikrobiyal duyarlılık testi yapılması gerekli olmamakla beraber, en azından direnç profili yüksek olarak tahmin edilen izolatlar uygulanmalı yada izole edilen izolatlar saklanarak belirli aralıklarla antibiyogramları çalışılıp duyarlılık ve direnç durumları raporlanmalıdır. Böylece, anaeroplardaki direnç durumu ile ilgili ülkemiz verilerine katkı sağlanabileceğini ve akılcı antibiyotik kullanımı için önemli bir veri elde edilebileceği düşüncesindeyiz.

7. SONUÇLAR

1. Çalışmaya alınan 357 örneğin 45'inde (% 12.6) sadece anaerop, 89'unda (% 24.9) sadece aerop/ fakültatif anaerop, 19'unda (%5.3) hem aerop hem de anaerop üreme saptandı. Örneklerin 204 (% 57.1)'ünde üreme olmamıştır. Anaerop istemle gelen ve işleme alınan kültürlerin 64'ünde (%17.9) anaerop üreme oldu (Tablo 15).

2. Örneklerin 224'ü (% 62.7) apse, 15'i (%4.2) asit mayi, 9'u(%2.5) safra sıvısı, 25'i (%7) plevra, 36 (%10)'sı eklem, 4 8 (%13.4)'i doku örneği idi. Toplam 359 örneğin 2 tanesi red kriterlerine göre (eküvyonla geldiği için) kabul edilmedi.

3. Kültürde üreyen anaerop bakterilerin çoğunluğu (%49.4) abse örneklerinden elde edilmiştir.

4. Anaerop istemle gelen ve işleme alınan kültürlerin 64' ünde (%17.9) anaerop üreme oldu. Anaerop üreme saptanan 64 örnekten 95 adet anaerop bakteri soyutlandı. Her bir anaerop üreme başına 1.4 adet anaerop bakteri üremesi oldu.

5. Üreme saptanan örneklerden toplam 219 mikroorganizma izole edilmiş olup bunların 95'i anaerop bakteri, 122'si aerop/ fakültatif anaerop bakteri ve 2'si *Candida* türü idi. 348 apse örneğinden 45'inde anaerop, 19'unda aerop ve anaerop bakteri soyutlandı.

6. Anaerop üreme olan örneklerde en çok Anaerop gram pozitif bakteriler (n:43) (%72.8) izole edilmiştir. Gram negatif bakteriler (n:16) (%27.2) daha düşük oranda saptanmıştır.

7. Gram negatif anaeroplardan en çok izole edilenler *Bacteroides fragilis* grup (n:5) ve *Prevotella* spp. (n:3) iken, gram pozitif anaeroplardan *Propionobacterium* spp. (n:10) ve *Actinomyces* spp. (n:8) olmuştur.

8. Test edilen antibiyotikler arasında en yüksek oranda direnç, Penisilin ve Metronidazole sırasıyla 42/59 (%71.1) ve 28/59 (%47.4) olarak tespit edildi. Sefoksitine direnç en az bulundu (7/59) (%11.8). *Bacteroides fragilis* grup izolatlarında metronidazol direnci 1/5 (%20) oranda saptandı.

9. Anaerop bakterilerin etken olduğu enfeksiyonların dünyada yaygın görülmesi, yüksek oranda mortalite ve morbiditeye neden olabilmesi, ampirik tedavinin etkinliğinin cins ve türler arasındaki direnç farklılıkları nedeniyle yetersiz olabileceği ve dünya çapında artan direnç profili nedeniyle etken mikroorganizmaların identifikasyonu ve antibiyotik duyarlılıklarının belirlenmesinin ve raporlanmasının önemli olduğu sonucuna varılmıştır.

8. KAYNAKLAR

1. Willke Topçu A., Söyletir G., Doğanay M., Anaerop Bakterilerin Genel Özellikleri. Enfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi 2 , Etkenlere Göre Enfeksiyonlar, Nobel tıp kitabevleri, İstanbul, p. 2319-2362, 2008.
2. Gürler, N., Anaerop İnfeksiyonlara Genel Bakış ve Antimikrobiyallare Direnç Durumu. Ankem Derg, 15(3): p. 593-599, 2001.
3. Gürler, N., Pasteur, Anaerobik yaşam ve fermentasyon, Ankem Derg., 25(Ek 2):1-4, 2011.
4. Aldridge, K.E. and M. O'Brien, In vitro susceptibilities of the *Bacteroides fragilis* group species: change in isolation rates significantly affects overall susceptibility data. Journal of clinical microbiology, 40(11): p. 4349-4352. 2002, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC139666/>.
5. Trinh, S. and Reysset ,G., Detection by PCR of the nim genes encoding 5-nitroimidazole resistance in *Bacteroides* spp. Journal of Clinical Microbiology, 34(9), 1996, p. 2078-2084, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC229193/>.
6. Aldridge, K.E., The occurrence, virulence, and antimicrobial resistance of anaerobes in polymicrobial infections, American journal of surgery, 169(5A Suppl), 1995, p. 2S-7S, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7755163>
7. Aldridge, K.E., et al., Bacteremia due to *Bacteroides fragilis* group: distribution of species, β -lactamase production, and antimicrobial susceptibility patterns. Antimicrobial agents and chemotherapy, 2003. 47(1): p. 148-153, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12499183>.
8. Gubina, M., Urbančič-Rovan, V. , and Tomič,V. Anaerobes isolated from clinical material over three years. Anaerobe, 1997. 3(2-3): p. 79-81, <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1075996497900743>
9. Koru, O., Ozyurt, M., Determination of antimicrobial susceptibilities of clinically isolated anaerobic bacteria by E-test, ATB-ANA and agar dilution, Anaerobe 14 2008: p. 161-165, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18424192>
10. Rosenblatt, J., E. Can we afford to do anaerobic cultures and identification? A positive point of view. Clinical Infectious Diseases, 1997: p. 25 (Suppl): S127-31, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9310651>.
11. Wybo, I., et al., Fourth Belgian multicentre survey of antibiotic susceptibility of anaerobic bacteria, Journal of antimicrobial chemotherapy, 2014. 69(1): p. 155-161, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24008826>.

12. Hecht, D.W., Prevalence of antibiotic resistance in anaerobic bacteria: worrisome developments, *Clinical infectious diseases*, 2004. 39(1): p. 92-97, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15206059>.
13. Kıyan, M., Anaerop bakteriler. Temel ve Klinik Mikrobiyoloji, Güneş Kitabevi p. 611-622, Ankara, 1999.
14. Gürler, N., Anaerop infeksiyonlar ve laboratuvar tanısı. Anaerop bakteri infeksiyonları (eds) Ulusoy S., Leblebicioğlu H. Bilimsel Tıp Yayınevi, Ankara, p. 9-34, 2005.
15. Töreci, K., Anaerop bakteriyolojinin tarihçesi ve önemi. XXVIII. Türk Mikrobiyolojisi Kongresi, Antalya, s. 93-96, 7-10 Mayıs 1996.
16. Bilgehan, H., Mikroorganizmaların metabolizması ve enzimleri. Temel Mikrobiyoloji ve Bağışıklık Bilimi, p. 103-19, Fakülteler Kitabevi Barış Yayınları, İzmir, 2002.
17. Winn WC, Koneman EW., Allen SD, Procop GW, et and al., The Anaerobic Bacteria. 877-944, Konemans Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia 2006.
18. Bilgehan, H., Mikroorganizmaların beslenmesi ve üretilmesi. Temel Mikrobiyoloji ve Bağışıklık Bilimi. p. 71-102, Fakülteler Kitabevi Barış Yayınları, İzmir 2002.
19. Levinson, W., Murray, P., Başlıca patojenlere genel bakış ve anaerop bakterilere giriş. Tıbbi Mikrobiyoloji ve İmmunoloji, Güneş Tıp Kitabevleri, Ankara 2018.
20. Torun M., Anaerop bakteri infeksiyonları: Kültürde sorunlar. XI. Türk Klinik Mikrobiyoloji ve İnfeksiyon Hastalıkları Kongresi, İstanbul, p. 25-28, 2003.
21. Aydın M., Anaerop bakteriler ve anaerobizm, Ed. Mısırlıgil, Cengiz, Aydın. Tıp ve diş hekimliğinde genel ve özel mikrobiyoloji, Güneş Yayınevi, Ankara, p. 569-576/91-110, 2004.
22. Finegold, S.M., Changes in taxonomy, anaerobes associated with humans, 2001–2004. *Anaerobe*, 2004. 10(6): p. 309-312, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16701532>.
23. Procop, G. W., Church, D.L., Hall, G.S., Janda, W. M., et and al., The Anaerobic Bacteria. seventh edition ed. Koneman's Color Atlas and Text Book of Diagnostic Microbiology, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 2017.
24. Namıkoğlu, L., Anaerobik enfeksiyonların patogeneze ve tedavisindeki yeni gelişmeler, *Mikrobiyol Bül.*, 24, 1990: p. 386-395, http://www.mikrobiyolbul.org/managete/fu_folder/1990-04/1990-24-04-386-

395.pdf. http://www.mikrobiyolbul.org/managete/fu_folder/1990-04/1990-24-04-386-395.pdf.

25. Bartlett, J.G., Anaerobic gram negative rods: Bacteroides, Fusobacterium. In: Gorbach SL, Bartlett JG, Blacklow NR (eds), Infectious Diseases, Philadelphia, WB Saunders, p. 1570-80, 1992.
26. Finegold, S.M., Anaerobic bacteria: General concepts, Mandell GL, Benett JE, Dolin R (eds), Principles and Practice of Infectious Diseases, New York, Churchill Livingstone: p. 2156-73, 1995.
27. Gürler, N., Anaerob infeksiyonlar ve laboratuvar tanısı. Anaerob bakteri infeksiyonları (eds) Ulusoy S., Leblebicioğlu H. Bilimsel Tıp Yayınevi, Ankara, 2005.
28. Bartlett, J.G., In: Gorbach SL, B.J., Blacklow NR (eds), *Clostridium tetani*. Infectious Diseases, WB Saunders, Philadelphia, 1992: p. 1580-3.
29. Birengel, S., Klostridiyal İnfeksiyonlar (Klinik Özellikler), Anaerob bakteri enfeksiyonları paneli, X. Türk Klinik Mikrobiyoloji ve İnfeksiyon Hastalıkları Kongresi, Program Kitabı, Adana, s:122-126. 15-19 Ekim 2001.
30. Özbakkaloğlu, B., Sporsuz anaerob bakteri enfeksiyonları. X. Türk Klinik Mikrobiyoloji ve İnfeksiyon Hastalıkları Kongresi, Adana, 15-19 Ekim 2001.
31. Citron, D. M., Rapid identification of anaerobes in the clinical laboratory, Article no.anae.1999.0286, 1999: p. 109-113, https://www.researchgate.net/publication/282727186_Rapid_identification_of_anaerobes_in_the_clinical_laboratory
32. Summanen, P., Baron, E., J., Citron, D., M., Strong, C., A., et and al., Wadsworth Anaerobic Bacteriology Manual, Fifth Edition, Star Publishing Company, Belmont, California, 1991.
33. Jousimies-Somer, H.R., Summanen, P., Citron, D.M., Baron, E.J., et and al, Specimen collection and anaerobic culture techniques. Anaerobic Bacteriology Manual. California: Star Publishing Company, p. 23-42, 2002.
34. Mangels, J.I., Isenberg, H.D., Anaerobic Bacteriology. Clinical Microbiology Procedures Handbook., Washington DC, 2004, p. p.4.11-4.12.6.
35. Ozinel, M., A., Diyabetik ayak infeksiyonları: Etkenler ve klinik mikrobiyolojik tanı. Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji AB Dalı, İzmir, Klimik Dergisi, 2003: p. 148-149.
36. Isenberg, H.D., Anaerobic Bacteriology, Culture media for anaerobes, Clinical Microbiology Procedures Handbook. 2th Edition, Section 4, Washington DC, 2004.

37. Citron, D.M., Hecht D.W., Duyarlılık Test Yöntemleri, Anaerobik Bakteriler, Bölüm: 76, Klinik Mikrobiyoloji, 9. Baskı , s.1214-1222.
38. Shah, H. N., Olsen, I., Bernard, K., Finegold, S., M., Gharbia, S., Gupta, R.S., Approaches to the study of the systematics of anaerobic, gram-negative, non-sporeforming rods: Current status and perspectives, Elsevier, Volume:15, 2009, p. 179-194,
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1075996409001206>
39. Türkan, A. A. , Klinik örneklerden soyutlanan anaerop bakterilerin tanımlanması ve E-test yöntemi ile Antibiyotik duyarlılıklarının belirlenmesi, Tıpta Uzmanlık Tezi, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Eskişehir, 2008.
40. Forbes, B. A., Sahm, D. F., Weissfeld, A. S., Anaerobic Bacteriology, Bailey & Scott's Diagnostic Microbiology. 12th ed. St. Louis, Missouri: Mosby Elsevier, 2007, p:455-477.
41. Montero, V. E., Identification of anaerobes in hospitals of chile, Elsevier, Anaerobe, Volume: 5, 1999, p.105-108,
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1075996499902901>
42. Engelkrik, P. G., Engelkrik, J. D., Anaerobes of Clinical Importance, Textbook of Diagnostic Microbiology, 3rd ed., St. Louis: Saunders Elsevier, 2007, p:587-664.
43. Durmaz, B., Anaerop bakterilerin identifikasyonunda sorunlar. 2003 XI Türk Klinik Mikrobiyoloji ve Enfeksiyon Hastalıkları Kongresi, Cilt:16, Özel sayı: 1, İstanbul, MART 2003.
44. Letournel-Glomaud, C., Haussaye, S., Milhaiha L., Ghnassia, J.C., E-test antibiotics susceptibility of strict anaerobic bacteria, Anaerobe 9, 2003: p. 281-284, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16887712>.
45. BioMerieux, Laboratory reagents and instruments, Anaerodiscs, France, 1980
46. Arellano, M., Jomard, P., Kaddouri, El S., Roques, C., Nepveu, F., Couderc, F., Routine analysis of short-chain fatty acids for anaerobic bacteria identification using capillary electrophoresis and indirect ultraviolet detection, Journal of Chromatography B, Biomedical Sciences and Applications, Elsevier, 2000, V:741, p. 89-100,
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10839136>
47. Veloo, A., et al., Identification of Gram-positive anaerobic cocci by MALDI-TOF mass spectrometry. Systematic and applied microbiology, 2011. 34(1): p. 58-62, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21292417>.
48. Song, Y., PCR-based diagnostics for anaerobic infections, Anaerobe 11 (1-2), (2005), p. 79-91, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16701536>.

49. Veloo, A. C. M., Welling, G. W. and Degener, J. E., The identification of anaerobic bacteria using MALDI-TOF MS, Elsevier, Anaerobe, 17(4), 2011, p. 211-212, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21515395>.
50. Lin, YT, Identification of clinically important anaerobic bacteria by an oligonucleotide array, J. Clin. Microbiol., 2010: p. 34 (1): 58-62, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2849602/>.
51. Goldstein, E.J. and Citron, D.M., Resistance trends in antimicrobial susceptibility of anaerobic bacteria, part I, Clinical microbiology newsletter, 2011, 33(1), p. 1-8, <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0196439910000589>
52. Snyderman, D.R., et al., Lessons learned from the anaerobe survey: historical perspective and review of the most recent data (2005–2007), Clinical Infectious Diseases, 2010, 50(Supplement_1), p. S26-S33, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20067390>
53. Nagy, E. and Urbán, E., Antimicrobial susceptibility of Bacteroides fragilis group isolates in Europe: 20 years of experience, Clinical Microbiology and Infection, 2011. 17(3): p. 371-379, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20456453>.
54. Akçınar, U.G., *Vankomisine Dirençli Enterekokların Maldi Tof ile tür tayini ve klonalitelerinin İncelenmesi*, Tıpta uzmanlık tezi, İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, İstanbul, 2013.
55. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing, Clinical Breakpoints, V.8.0, 1 Jan, 2018, eucast.org.
56. Türkkan, A.A., *Klinik Örneklerden Soyutlanan Anaerop Bakterilerin Tanımlanması ve E-test yöntemi ile Antibiyotik Duyarlılıklarının Belirlenmesi*, Tıpta Uzmanlık Tezi, Eskişehir Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Eskişehir, 2008.
57. Schuetz, A.N., *Antimicrobial resistance and susceptibility testing of anaerobic bacteria*, Clinical infectious diseases, 2014, 59(5), p.698-705, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24867792>
58. Jeverica, S., et al., *Evaluation of the routine antimicrobial susceptibility testing results of clinically significant anaerobic bacteria in a Slovenian tertiary-care hospital in 2015*, Anaerobe, 2017, 47, p. 64-69, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28433670>
59. Demir, C., *Çeşitli Klinik örneklerden izole edilen gram negatif anaerop çomakların tiplendirilmesi ve antibiyotik direnç profillerinin E test yöntemi ile belirlenmesi*, Yüksek lisans tezi, Afyon Kocatepe Üniversitesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Afyon, 2015.

60. Uysal, E.B., et al., *Klinik örneklerden izole edilen anaerobik bakteriler: Yedi yıllık değerlendirme*. Cumhuriyet Medical Journal, 2014, 36(3), p. 327-331. <http://dergipark.gov.tr/download/article-file/48107>
61. Doğan, M. and Baysal, B. *Identification of anaerobic bacteria isolated from various clinical specimens and determination of antibiotic susceptibilities*, Mikrobiyol Bul., Vol. 44. 2010. 211-9, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20549955>
62. Kaya, S., *Klinik örneklerden izole edilen anaerob bakterilerin laboratuvar tanisi ve antibiyotik duyarlılıklarının belirlenmesi*, Yüksek Lisans Tezi, GATA Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim dalı, 2012, Ankara.
63. Ercis, S., Tunçkanat, F., Haşçelik, G., *Anaerob infeksiyon şüpheli hastalardan izole edilen anaerob bakteriler*. Mikrobiol Bült., 2005: p. 39:447-54, http://www.mikrobiyolbul.org/managete/fu_folder/2005-04/2005-39-04-447-454.pdf
64. Taner, Z., *Tüberküloz dışı mastitlerin etiolojisinde rol alan aerob ve anaerob bakterilerin dağılımı ve antimikrobik maddelere direnç durumları.*, Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Üniversitesi, İstanbul, 2015.
65. Coltella, L., et al., *Advancement in the routine identification of anaerobic bacteria by MALDI-TOF mass spectrometry*, European journal of clinical microbiology & infectious diseases, 2013. 32(9), p. 1183-1192, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23584672>
66. Bennion, R.S., et al., *Gangrenous and perforated appendicitis with peritonitis: treatment and bacteriology*. Clin Ther, 1990. 12 Suppl C, p. 31-44, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2202510>.
67. Saini, S., et al., *Role of anaerobes in acute pelvic inflammatory disease*, Indian Journal of Medical Microbiology, 2003. 21(3): p. 189-192, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17643017>
68. Zahar, J.R., et al., *Incidence and clinical significance of anaerobic bacteraemia in cancer patients: a 6-year retrospective study*, Clinical Microbiology and Infection, 11(9): p. 724-729, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16104987>
69. Ülger, T. N., ve ark., *Enterotoksin geni pozitif ve negatif Bacteroids fragilis izolatlarının antibiyotiklere direnç durumlarının karşılaştırılması.*, Mikrobiyol bült. , 2005: p. 39: 145-152, http://www.mikrobiyolbul.org/journal_issue_view.aspx
70. Barberis, C., et al., *Antimicrobial susceptibility of clinical isolates of Actinomyces and related genera reveals an unusual clindamycin resistance among Actinomyces urogenitalis strains*, Journal of Global Antimicrobial

Resistance, 2017, 8, p. 115-120,
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28109846>

71. Liderot, K., et al., *Microbiological diagnosis of Eggerthella lenta blood culture isolates in a Swedish tertiary hospital: Rapid identification and antimicrobial susceptibility profile*, *Anaerobe*, 2016. 38, p. 21-24,
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26612006>

